

The background of the book cover is a composite image with a cyan and green color scheme. It features a petri dish on the left with various bacterial colonies, some appearing as white fuzzy patches and others as dark, irregular shapes. On the right, there is a glass flask containing a liquid, with a test tube or pipette positioned above it. The overall image has a grainy, scientific quality.

**З.Ш.СОБИРОВА ,
Т.А.АЛЁХИНА , В.Б. ФАЙЗИЕВ**

ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

**МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ И
ИННОВАЦИЙ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН**

**ЧИРЧИКСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

З.Ш.СОБИРОВА, Т.А.АЛЁХИНА, В.Б. ФАЙЗИЕВ

**ОБЩАЯ
МИКРОБИОЛОГИЯ**

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЗАНЯТИЙ

Чирчик-2024

УДК 579.2
КБК 28.4
С-19

**З.Ш.СОБИРОВА, Т.А.АЛЁХИНА, В.Б.ФАЙЗИЕВ / ОБЩАЯ
МИКРОБИОЛОГИЯ** / Учебное пособие – Чирчик: «Ilm nurli kitob»,
2024 г. 156 стр.

Учебное пособие «Общая микробиология» разработано для проведения лабораторных занятий по дисциплине «Общая микробиология». Данное пособие составлено на основе учебного плана дисциплины «Общая микробиология» и предназначается для студентов, обучающихся в педагогических вузах по направлениям: «5110400-Методика преподавания биологии» и «5140100-Биология», а также руководство по проведению лабораторных занятий на основании учебной программы по дисциплине «Микробиология и вирусология» и «Микробиология и методы исследования вирусологии» в магистратуре, а также для научных сотрудников, проводящих исследования в области микробиологии.

Present manual laboratory work on microbiology is prepared for Conduction laboratory work for student of high education establishments, training on the discipline of "Biology" in accordance with existing program of Bachelor's degree on the subject "Microbiology and virology". As well as for Master's degree students on a special course "The methods of researching microbiology and virology" and for senior researchers, who conduct the research's on microbiology.

Разработчики:

Собирова З.Ш – преподаватель кафедры «Биология» ЧГПУ.

Алёхина А.Т. – доцент кафедры микробиологии МГУ, доктор биологических наук.

Файзиев В.Б. - заведующий кафедрой биологии ЧГПУ, доктор биологических наук, доцент.

Рецензенты:

Т.С.Хусанов - старший научный сотрудник Института Микробиологии при Академии наук Республики Узбекистан, доктор философии биологических наук (PhD).

И.В.Сафаров - доцент кафедры биологии ЧГПУ, кандидат биологических наук.

УДК 579.2
КБК 28.4

ISBN 978-9911-264-78-7

© Собирова З.Ш. и др., 2024
© «Ilm nurli kitob», 2024

ВВЕДЕНИЕ

Мир микроорганизмов — это невидимая форма жизни, очень распространенная на земле и имеющая большое значение в жизни человека. Обитающие в 4 различных средах: воде, воздухе, почве и живых организмах, имеющие разнообразные формы: палочковидные, сферические, спиральные, в форме вибриона, микроорганизмы играют очень важную роль в периодическом круговороте вещества и энергии на Земле. Каждая из этих сред имеет свою группу микроорганизмов, которые обладают способностью положительно и отрицательно взаимодействовать с организмами, обитающими в этой среде. Например, почва, являющаяся одной из перечисленных выше сред, является общей средой для микроорганизмов, которые за счет своей деятельности повышают плодородие почвы, охраняют растения от различных болезней.

Принимая во внимание вышеизложенное, по предмету «Общая микробиология», нехватки учебников на русском языке, в основном для лабораторных работ, приводит к ряду проблем. Эти проблемы требуют подготовки учебников на русском языке для учащихся педагогических вузов. Поэтому данное учебное пособие подготовлено своевременно и имеет важное значение для углубления знаний учащихся.

Данное учебное пособие состоит из несколько отделов, включающих информационных и практических блоков.

Информационный блок содержит теоретический материал, необходимый для освоения данной темы и ответов на вопросы для самоподготовки. В этот блок включена информация, недостаточно изложенная в основном учебнике по микробиологии, для более полной подготовки к занятию. Информационный блок обильно иллюстрирован авторскими схемами, рисунками и таблицами.

Практический блок состоит из описания практической работы студента на данном занятии с подробным изложением методик окраски препаратов, посевов, серологических реакций. В конце приведен протокол, в который студент должен записать полученные результаты и при необходимости сделать свое заключение.

В конце каждого занятия приведены тестовые задания и ситуационные задачи для проверки знаний студента по данной теме. Кроме практических занятий в пособии присутствуют инструкции по приготовлению среды для культивирования микроорганизмов.

При подготовке данного пособия использованы некоторые учебники, в соответствии с современными тенденциями подготовки учебников, подготавливаемых в нашей стране в области микробиологии, в том числе: Вахобов А.Х., и др. "Учебное пособие по общей микробиологии" (2009) на узбекском языке и Звягинцев Д.Г., «Биология почвы : Учебник. - 3-е изд., испр. и доп.» (Изд-во МГУ, 2005).

Кроме того, данное пособие основано на отзывах экспертов, в которых коллектив авторов хотели бы выразить свою благодарность за высказанные отзывы.

ПЕРВАЯ ЧАСТЬ

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Микроорганизмы — это невидимые невооруженным глазом существа. Они отличаются друг от друга морфологическими, физиологическими и биохимическими свойствами. По клеточному строению все микроорганизмы делятся на прокариоты и эукариоты. Ядерный аппарат прокариот называется «нуклеоидом», и он часто содержит одну хромосому, кольцеобразную молекулу ДНК. У эукариот ядро содержит ряд хромосом и отделено от цитоплазмы мембраной. Кроме того, эукариоты имеют структурные и функциональные органоиды, которые у прокариот отсутствуют.

Прокариоты

Среди прокариотов различают бактерии (или эубактерии) и археи (архебактерии). Большинство прокариот относятся к разным группам эубактерий. Прокариоты, в основном одноклеточные организмы, в среднем размером 0,2-10,0 мкм. Форма бактерий может быть палочковидной, шаровидной (кокки) и скрученной — вибрионы, спириллы и спирохеты. Кроме того, были обнаружены клетки треугольной, квадратной и опуховидной формы. Сбор клеток иногда помогает определить систематическое расположение бактерий. Они могут быть одинарными, двойными, коротко- и длинноцепочечными (стрептококки), неправильными (стафилококки), в виде пучков (сарцины), решетчатыми и розетковидными. Большинство бактерий из группы актиномицетов продуцируют мицелий. Также были обнаружены колониальные прокариоты, образующие трихомы.

1.1.1. Строение прокариот

Большинство прокариот имеют полисахаридную клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану под ней. Строение и состав клеточной стенки — важный таксономический признак, на основании которого прокариоты делят на следующие группы: грамположительные, грамотрицательные, бактерии без клеточной стенки и археи. Грамположительные бактерии имеют более высокое содержание муреина (пептидогликана) в клеточной стенке, чем грамотрицательные бактерии, и не имеют наружной мембраны. Археобактерии замещают муреин, преимущественно псевдомуреин.

У большинства бактерий на поверхности есть фибриллы или пили, а у подвижных бактерий имеются жгутики. Большинство бактерий имеют на поверхности капсулы разной толщины. В основном они состоят из полисахаридов, гликопротеинов и полипептидов.

Внутриклеточное строение прокариот простое. Большинство бактерий содержат примеси. Среди них продукты цитоплазматической мембраны; фототрофы содержат хроматофоры и тилакоиды, внутренние мембраны нитрифицирующих и метанооксилирующих бактерий. Некоторые бактерии имеют газовые вакуоли (аэросомы). Большинство бактериальных клеток содержат запасные вещества. Некоторые спорообразующие виды имеют параспоровые тела, содержащие белок.

1.1.2. Рост и размножение прокариот

Большинство бактерий размножаются делением надвое. Есть и такие, которые размножаются почкованием. Актиномицеты размножаются спорами или фрагментами мицелия. Ряд цианобактерий размножаются фрагментацией

тела на многие части. Колониальные прокариоты размножаются делением нескольких клеток от трихом.

1.2. Эукариоты

Эукариоты в отличие от прокариот, включают микроорганизмы и макроорганизмы. Эукариотические микроорганизмы включают себе грибы, ряд водорослей и простейших животных.

1.2.1. Грибы

Грибы — наиболее распространенные в природе гетеротрофные микроорганизмы, большинство из которых — сапрофиты. Но встречаются и паразитические виды. Основной особенностью большинства грибов является образование мицелия. Различают 3 группы микроскопических грибов: зигомицеты, аскомицеты и дейтеромицеты. Дрожжи, один из основных объектов микробиологов, входят в состав аскомицетов. Дрожжи представляют собой малоподвижные отдельные клетки, размножающиеся преимущественно почкованием. Дрожжи, широко используемые в микробиологических исследованиях, относящиеся к роду *Saccharomyces*, например, *S. cerevisiae*.

1.3. Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы

Одним из факторов, влияющих на микроорганизмы, является температура. Оптимальная температура для мезофилов 25-40°C. На дне океанов, тундр живут психрофильные микроорганизмы, оптимальная температура для них 5-15°C. Экстремальные термофилы могут жить при 70-110°C.

Осмотическое давление является одним из факторов, влияющих на рост микроорганизмов. Большинство организмов не переносят концентрации 0,5 М NaCl, в то время как

экстремальные галофилы устойчивы к 2,5 М NaCl и могут жить в более высоких концентрациях.

Микроорганизмы также чувствительны к кислотности окружающей среды. Экстремальные ацидофилы живут при pH 0,5-1,0, алкалофилы - при pH 10,0-11,0, но основные группы микроорганизмов живут при нейтральном pH. Их называют нейтрофилами. По отношению к молекулярному кислороду делятся на истинные аэробы и анаэробы. Микроорганизмы, способные жить в среде с низким содержанием кислорода (1,0-5%), называются микроаэрофилами. Выделяются также факультативные, аэротолерантные и истинные анаэробы.

1.4. Метаболизм в микроорганизмах

Конструктивные и энергетические процессы, происходящие в микроорганизмах, многогранны. По соединениям углерода, используемым в конструктивном обмене, микроорганизмы делятся на автотрофы и гетеротрофов. Основную часть гетеротрофов составляют сапрофиты. Возможности микроорганизмов в усвоении соединений азота широки. К микроорганизмам относятся те, которые поглощают молекулярный азот из атмосферы, те, которым нужны готовые аминокислоты, и те, которые поглощают азот из неорганических соединений. Такие элементы, как фосфор и сера, получают микроорганизмами из фосфатных, сульфатных и восстановленных соединений серы. К числу энергетических процессов, осуществляемых микроорганизмами, относятся фотосинтез, пищеварение, аэробное и анаэробное дыхание.

1.5. Распространение и значение микроорганизмов

Микроорганизмы активно участвуют в круговороте веществ на Земле. Усваивая различные органические соединения, поглощая CO и CO₂, образуя и усваивая метан, они

активно участвуют в круговороте углерода. Микроорганизмы усваивают азот, окисляют аммиак и нитриты, осуществляют денитрификацию. Они обеспечивают круговорот азота в природе, окисляя восстановленные соединения серы и обращая круговорот серы окисленных соединений. Некоторые микроорганизмы вызывают заболевания у человека и других организмов, приводя к гниению сельскохозяйственной продукции, зданий, трубопроводов, металлоконструкций. Хлеб, вино, пиво, квас, различные молочные продукты, ацетон, бутанол, уксус, лимонная кислота, витамины, ферменты, антибиотики и т.д. получают с использованием бактерий и грибов. Практическое значение микроорганизмов неизмеримо.

ВТОРАЯ ЧАСТЬ

ЛАБОРАТОРИЯ МИКРОБИОЛОГИИ И ПРАВИЛА ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

Лабораторная работа №1

Тема: Правила работы с микроорганизмами

Одним из важных факторов, обеспечивающих целостность экологических систем в природе, является накопление микроорганизмов. При определенных условиях микроорганизмы могут быть единственной формой жизни. В ходе эволюции совершенствовались разные типы взаимоотношений между ними (симбиоз, мутуализм, паразитизм и др.).

Цель занятия: Ознакомить учащихся с правилами работы с микроорганизмами и асептикой в лаборатории микробиологии.

Теоретическая информация

Популяцию живых микроорганизмов называют бактериальной культурой. В лаборатории культуры микроорганизмов выращивают в разных формах (на жидких питательных средах, на агаризованном «кривоагаре» (стерилизованная агаризованная среда наклонена и закреплена под определенным углом), на плотных питательных средах в чашках Петри). Только культуры микроорганизмов, которые имеют один вид называют чистой культурой. Микробиологи почти всегда работают с чистыми культурами микроорганизмов. Если культура состоит из более чем одного вида микроорганизмов, она называется смешанной культурой или не чистой культурой. Это одна из основных задач микробиологов. В противном случае результаты, полученные в исследованиях, будут неточными.

Согласно асептической методике, микроорганизмы выращивают на стерилизованной питательной среде и эта среда защищена от попадания окружающих микроорганизмов. При посеве чистой культуры на питательную среду соблюдают следующие правила асептической техники:

1) все предметы, которые могут соприкасаться с чистой культурой, предварительно стерилизуются;

2) питательная среда стерилизуется;

3) следует соблюдать осторожность, чтобы избежать заражения культуры при посадке и пересадке. Для этого принимаются следующие меры:

а) все емкости и питательные среды немедленно стерилизуют по мере их готовности;

б) питательные среды хранятся в закрытых емкостях для предотвращения попадания микробов с воздуха. В нем используются ватные и марлевые пробки, и их убирают только во время посадки, но никогда не кладут на стол или на другой предмет;

с) все инструменты, которые могут соприкасаться со стерильными контейнерами и их стерильными средами и чистыми культурами, должны быть предварительно стерилизованы, например, бактериологическая петля;

ж) горлышки пробирок и колб, используемые при посеве и пересадке, перед работой воспаляются и оставляются открытыми на как можно более короткое время;

г) рабочее место защищено от загрязнения микроорганизмами, бактериальные петли стерилизуются даже после использования, а пипетки помещены в дезинфицирующие жидкости.

Ход работы:

В лаборатории часто проводят такие операции, как посев из жидкой среды в пробирке в среду в другой пробирке или посев в твердую агаровую среду в чашке Петри. Студенты должны научиться применять правила асептики на практике, выполняя такие упражнения. При посеве из пробирки в пробирку выполняют следующие работы:

1. На пробирках восковой ручкой пишут фамилию учащегося и номер группы.

2. Бактериальная петля прокаливается до угольного состояния в верхней части пламени (рис. 1) и охлаждается в течение 10 мин, но не ставится на стол.

3. Лево́й рукой извлеките культуральную пробирку и снимите пробку с пробирки свободными пальцами руки, держащей петлю, но при этом пробку держат, не ставя на стол. Горловину пробирки кратковременно нагревают в пламени (рис. 2 и 3).

4. Используя петлю, удалите жидкость из пробирки (рис. 4-5) так, чтобы петля не касалась внутренней части пробирки.

5. Горловину и пробку пробирки нагревают в пламени, пробирку закрывают и снова ставят на штатив.

6. Берут пустую ручную пробирку и открывают ее, как описано выше, и нагревают рот для стерилизации.

7. Жидкую культуру в петле медленно добавляют к раствору, затем перемешивают.

8. Чтобы капли остались в петле, петлю прикасаются к концу жидкости внутри раствора.

9. Петлю медленно снимают и пробирку затыкают горлышком, пробирку закрывают и ставят на штатив.

10. Петля нагревается до угольного состояния.

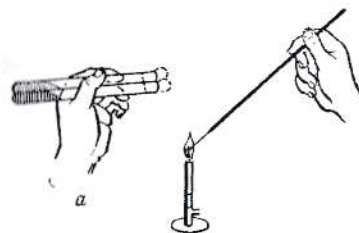


Рис. 1. Стерилизация бактериальной петли нагреванием пламенем

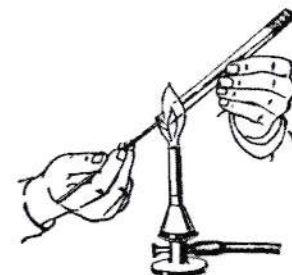


Рис. 2. Получение чистой бактериальной культуры

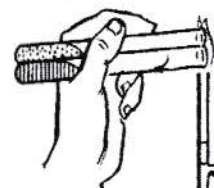


Рис. 3. Кратковременное нагревание: взятие жидкости из нагревание горлышка пробирки

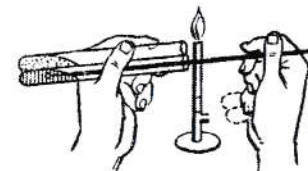


Рис. 4. Нагревание с пробирки при помощи петли

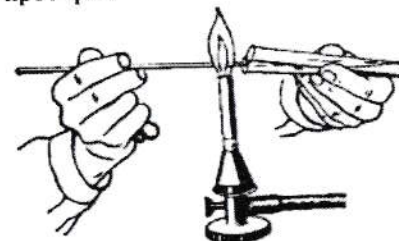


Рис. 5. Перенос жидкости из одной пробирки в другую с помощью бактериальной петли

При посеве из пробирки в чашку Петри выполняют следующее:

1. С помощью воскового карандаша напишите имя учащегося, номер группы и дату на чашке Петри.

2. Как было сказано выше, культуру берут из пробирки петлей.

3. Пустой рукой откройте крышку чашки Петри, но не ставьте ее на стол и держите над чашечкой.

4. В питательную среду на чашку Петри культуру с петли высаживают методом «штрих». Следует соблюдать

осторожность, чтобы не разрезать агар (рис. 6).

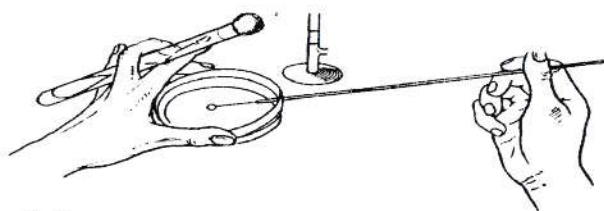


Рисунок 6. Высаживание в питательную среду на чашку Петри культуру с петли методом «штрих»

5. Чашка Петри закрывается.

6. Петля прожигается и устанавливается на место. Рассадку выращивают при температуре 28°C до следующего занятия. При соблюдении правила асептики на чашке Петри будет расти только чистая культура, а при несоблюдении правила на чашке вырастут колонии бактерий разного цвета и размера. Когда препарат готовят и рассматривают под микроскопом, в поле зрения можно наблюдать микроорганизмы разной формы и размера, помимо той культуры, с которой мы работаем. Метод работы с такими микроорганизмами нарушает правила микробиологической асептики и требует повторной работы.

Контрольные вопросы:

1. Опишите чистую культуру бактерий.
2. Что такое асептика и антисептика?
3. Приведите примеры правил асептики, которые применяются в лаборатории.
4. Приведите примеры правил антисептики, которые применяются в лаборатории.
5. Как происходит посев из пробирки в чашку Петри?
6. Как составляется кривая, если?
7. Как засеять микроорганизмов чашку Петри методом бруска?
8. Что такое бактериальная культура?

Лабораторная работа № 2

Тема: Оборудование, необходимое для микробиологических исследований

Цель занятия: Ознакомить учащихся с оборудованием, используемым в микробиологических лабораториях, дать информацию о принципах их работы, применения.

Теоретическая информация:

Оборудование для инкубации. Термостат - является одним из необходимых устройств микробиологической лаборатории, в котором постоянно поддерживается температура и создаются благоприятные условия для инкубации культур микроорганизмов. Бактериологический термостат выполнен в виде шкафа, состоящего из стенки из двух слоев медной пластины, между которыми слои заполнены дистиллированной водой. Вода, окружающая все части стенок шкафа, нагревается за счет автоматического подключения и разделения с помощью электрических элементов. К внутренней откидной стенке шкафа прикреплены металлические уголки, которые служат для удержания полок с алюминиевой сеткой. В теплоизоляции термостата используются асбест и минеральная вата. В верхней части термостата есть два маленьких отверстия (открытых), первый из которых предназначен для термометра, второй для вентиляции.

Через изолированную дверь можно наблюдать за культурами, находящимися внутри термостата, не открывая застекленного окна. Дополнительное отверстие сверху предназначено для выливания воды, трубка для счетчика воды и терморегулятора.

Различные жидкие дезинфицирующие средства (70% этанол, стерогенол), дают хорошие результаты для стерилизации рабочей камеры термостата. Не рекомендуется использовать для этой цели различные кислоты и щелочи, так

как эти вещества могут вызвать коррозию ее стенок и дна. Не допускается заполнение внутренней части водной оболочки водопроводной водой.

При той же температуре лаборатории, в которых инкубируется большое количество культур микроорганизмов (производственные, научно-исследовательские и мониторинговые учреждения образования), должны быть оборудованы теплоизолированными и специально отапливаемыми термостатными помещениями. Культуры микроорганизмов можно размещать на полках вплотную к стене. При дезинфекции таких помещений эффективны аэрозольные дезинфицирующие средства.

Анаэроостат - представляет собой толстостенный металлический сосуд с герметичной крышкой, манометром и двумя кранами. Один из них используется для поглощения воздуха, а другой - для наполнения его инертными газами (аргоном, азотом, водородом, гелием). Анаэроостат длительное время поддерживает вакуумные условия, что способствует размножению и очистке анаэробных микроорганизмов, обычно микроорганизмы выращивают в чашках Петри и пробирках. После размещения культур анаэроостат герметизируют и всасывают воздух, уравнивают до 15-20 мм. Затем анаэроостат наполняют определенным газом или помещают в термостат, чтобы поддерживать определенную температуру, когда он не заполнен. Необходимо ежедневно контролировать манометр анаэроостата и при необходимости отсасывать из него воздух.

Для контроля количества кислорода используются специальные индикаторы, которые крепятся на стеклянной трубке, размещенной на стенке анаэроостата.

В некоторых случаях вместо анаэроостата можно использовать вакуум-эксикатор, но он не снабжен манометром, а вакуум в этом случае можно контролировать с помощью одного кислородного индикатора.

В Германии и ряде других стран для размножения анаэробных бактерий выпускаются анаэробные термостаты, в которых температура составляет 30-70°C и создаются атмосферные условия без нейтрального кислорода.

Холодильники. В лабораториях обычно используются бытовые холодильники, но для научных исследований требуется специальное устройство, такое как SR-114 Labor, которое имеет систему обогрева и охлаждения, позволяющую быстро и точно поддерживать необходимый температурный режим. Лабораторные холодильники поддерживают температуру в пределах 4-5°C и широко используются. В них могут храниться приготовленные и нестерилизованные питательные среды (сроком не более суток), почва, навоз и пробы растений, отобранные для осмотра.

Микробиологический анализ таких собранных образцов должен быть проведен как можно быстрее, так как их микрофлора может различаться по количеству и качеству.

Культуры микроорганизмов следует хранить в отдельном холодильнике (5°C) для предотвращения повреждения влагой. Емкости, содержащие летучие вещества и газы, должны быть герметично закрыты. Хранение пищевых продуктов в микробиологической лаборатории строго запрещено.

Шкафы, ламинарные ящики и боксы для рассады.

Шкафы для посева в микробиологической практике будут изготовлены из нержавеющей стали. Верхняя часть лицевой поверхности этих шкафов выполнена из стекла и размещена горизонтально под углом 45°. Внизу есть место для двух специальных рук, в которых крепятся резиновые перчатки. В задней части шкафа будут крепиться трубы для электро и газоснабжения. Их стерилизуют с помощью дезинфицирующих средств или ультрафиолетовых ламп. В последние годы вместо стерилизационного бокса стали использовать ламинарный бокс. Передняя часть ламинарного бокса находится в

полностью открытом положении и в него постоянно вдувается постоянный и медленный поток стерилизованного воздуха. Ламинарный поток воздуха проходит через 0,3 мкм фильтр "Нера". В зависимости от направления воздушного потока ламинарные боксы делят на вертикальные и горизонтальные (7-рисунок).

Специальный бокс для рассады является частью лаборатории, позволяющей работать в стерильном состоянии. Сантехнические и газовые трубы будут покрыты влагостойкими материалами и закреплены на стене. Стерилизация салона осуществляется с помощью установленной на нем кварцевой лампы.

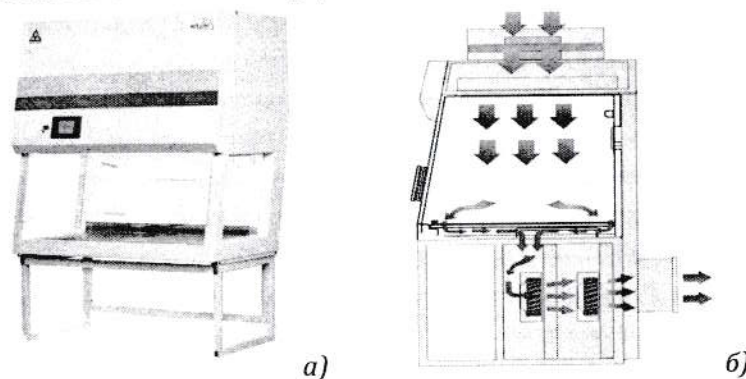


Рисунок 7. Ламинарный бокс (а) и поток воздуха в нем (б).

Для стерилизации используются различные устройства, сегодня используются автоклавы. На сегодняшний день существуют вертикальные и горизонтальные типы автоклавов, которые используются в операциях полной стерилизации (рисунок 8).

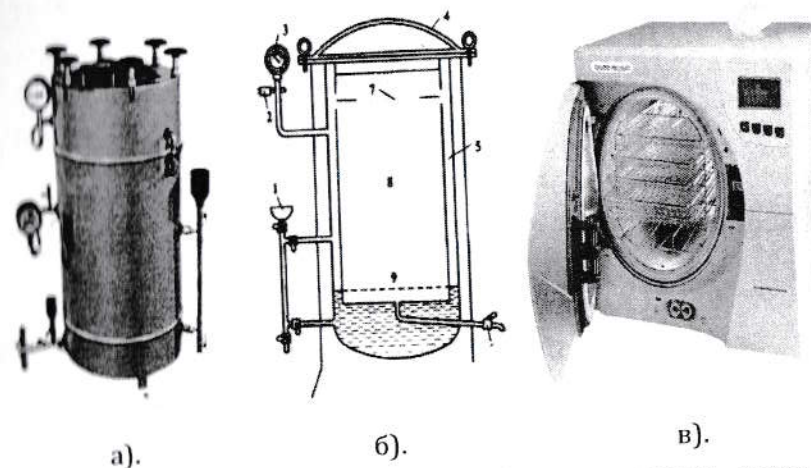


Рисунок 8. Виды автоклавов: а) вертикальный автоклав; б) сечение автоклава и части; в) современный автоклав: 1-воронка для заливки воды в автоклав; 2-клапанные предохранители; 3-манометр; 4-крышка автоклава; 5-камера водяного пара; 6-кран для выхода воздуха; 7-отверстие для входа пара; 8-стерилизационная камера; 9-основание для стерилизованных предметов.

В лаборатории микроорганизмы выращивают на твердых и жидких питательных средах, разлитых в пробирки, матрацы, колбы или чашки Петри (рис. 9). Необходима стерилизация питательных сред и контейнеров. Способы приготовления и стерилизации питательных сред будут рассмотрены в следующих разделах.

Перенос микроорганизмов на стерилизованную среду *посадка* или называется *прививкой*. При посадке микроорганизмов необходимо соблюдать установленные правила во избежание попадания других микроорганизмов. Перед посевом в пробирку (пробирку или чашку Петри) следует внимательно записать название микроорганизма и время посева.

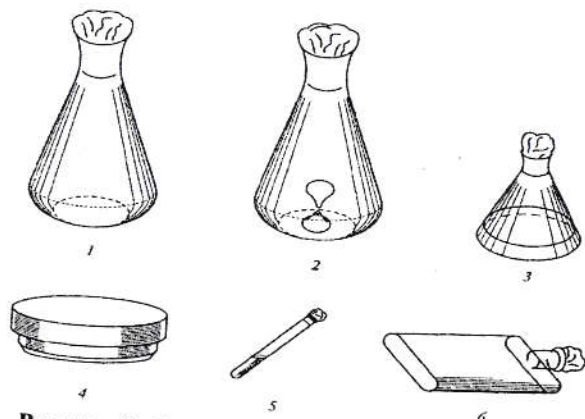


Рисунок 9. Сосуды, необходимые для размножения микроорганизмов: 1-2 -качальная колба; 3-коническая колба; 4-чашка Петри; 5- пробирка; 6-матрац.

Клетки микроорганизмов, полученные для культивирования, являются бактериологическими. получают с помощью петли или иглы (рис. 10), если микроорганизм выращивают на плотной питательной среде. Если микроорганизм выращивается на жидкой питательной среде, его удобно засеивать стерильной пипеткой, а не петлей. Бактериологическая петля и игла изготавливаются из тонкого вольфрама или нихрома и закрепляются на металлической или стеклянной ручке. Бактериологический кончик петли диаметр петли достигает до 4-5 мм.

Для получения клетки микроорганизма с помощью бактериологической петли (иглы) необходимо ее простерилизовать. Для этого петлю нагревают на огне до тех пор, пока лак не приобретет угольно-черный цвет, и нагревают на огне половину ручки петли по мере ее введения в емкость, в которую высажен микроорганизм. Требуется удержание петли в почти вертикальном положении на пламени газовой горелки. Следует отметить, что максимальная температура пламени газовой горелки формируется на ее конце и с центральной части к краю (рисунок-11), поэтому опускать петлю на полную газовую горелку не рекомендуется.



Рис.10. Бактериологическая петля (1), и бактериологическая игла (2)

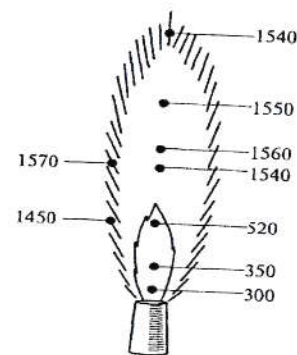


Рис.11. Температура (°C) газовой горелки и различных пламени сечений.

Не рекомендуется сразу опускать иглу в емкость, в которую был посажен микроорганизм. Чтобы не повредить клетку микроорганизма, петлю (иглу) сначала охлаждают, а затем прикасаются к свободной от микроорганизмов поверхности питательной среды в емкости и получают небольшое количество культуры микроорганизма.

Ход работы:

1. Ознакомиться с теоретическими сведениями об оборудовании микробиологических лабораторий;
2. Усвоить информацию о функций этих устройств;
3. В лаборатории микробиологии освоить технику нагревания с участием преподавателя и лаборанта.



Контрольные вопросы:

1. Знаете ли вы, какое оборудование используется в лаборатории микробиологии и для чего используются эти приборы?
2. Какое оборудование входит в состав инкубационного оборудования и для каких целей оно используется?

3. Какова конструкция термостата?
4. Что такое анаэроустат и для чего он нужен?
5. Каково устройство автоклава и каково его назначение?
6. Каково назначение холодильного оборудования?
7. Для чего предназначена бактериологическая петля?
8. Какие типы автоклавов существует?

Лабораторная работа №3

Тема: Ознакомление с лекарственными средами и методы их стерилизации.

Цели курса: Познакомить учащихся со стерилизацией и методами стерилизации и предоставить информацию о том, для чего они используются.

Необходимое оборудование: Фальга, посуда, бактериологическая петля, различные красители (щелочной фуксин, генцианвиолет), автоклав, термостат, анаэроустат, посуда и покровные стекла, чашки Петри, пипетки разных размеров, электронная доска, световой микроскоп с цифровой камерой и т. д.

Теоретическая информация

Стерилизация является одним из важнейших и необходимых методов, используемых в практике микробиологии. Слово «стерилизация» происходит от латинского языка и означает «стерилизация». В практической работе под стерилизацией понимают методы, обладающие способностью разрушать поверхность стерилизуемого объекта и жизненную форму внутри. В целом выделяют два вида стерилизации, которые делятся на горячую и холодную стерилизацию. Горячая стерилизация включает нагревание и сжигание в огне, стерилизацию сухим жаром (с использованием горячего воздуха), насыщенным паром и давлением (автоклавирование), кратковременное выпаривание (тендализация) и стерилизацию кипячением.

Холодная стерилизация включает стерилизацию фильтрованием, стерилизацию газами, химическую стерилизацию, стерилизацию ультрафиолетовыми и другими лучами.

Стерилизация (автоклавирование) питательной среды насыщенным паром и давлением.

Применение высокой температуры и давления обеспечивает эффективность этого метода (таблица 1).

Таблица 1

Температура накопленного пара

Давление		Температура, °C
Нормальное атмосферное давление	кПа	
1,0	101,32	100
1,5	151,98	111
2,0	202,65	121
2,5	251,20	128
3,0	299,75	134

При этом погибают вегетативные клетки всех микроорганизмов и их споры. Установлено, что споры большинства микроорганизмов выдерживают до 5 минут в насыщенном паре при температуре 121°C. Такие условия приводят к гибели клеток и спор микроорганизмов. Стерилизацию с помощью давления и проходящего пара проводят в автоклаве.

Автоклав представляет собой специальное устройство с двустенным металлическим корпусом высокого давления и камерой, в которую помещаются стерилизуемые предметы (рисунки). Не складывайте в него плотно стерилизованные вещи, не следует нагревать, если между ними не проходит пар, создавая достаточную температуру, вещи могут не

постерилизовываться. После завершения стерилизации давление внутри автоклава можно открыть после того, как оно сравняется с внешним атмосферным давлением. Быстрое открывание ручки автоклава может вызвать быстрое падение давления внутри него и разрыв пробок кипящих питательных сред под действием высокой температуры и нарушением стерилизации.

К работе в автоклаве допускаются только специально обученные люди!

Подготовка питательной среды к стерилизации. В культурную среду рекомендуется добавлять около 5% дистиллированной воды с учетом испарения при автоклавировании 3-5% жидкости. Затем, после стерилизации, питательная жидкость имеет необходимую концентрацию. Обычно питательные среды стерилизуют в пробирках, колбах и другой стеклянной посуде. В эти емкости питательная среда добавляется наполовину, чтобы ее пробка не намокла. Емкости с питательными средами накрывают ватными тампонами и бумажными крышками. Пробки из стекла, резины и других материалов заворачивают в два слоя оберточной бумаги и стерилизуют в герметичной посуде.

Выбор режима автоклавирования. В микробиологической практике автоклавирование проводят при 111-138°C, при давлении от 0,5 до 2,5 атм. Температуры ниже 111°C не считаются достоверными; Высокая температура 138°C считается опасной при работе автоклава, так как чем выше давление пара, тем выше его температура. В микробиологической практике стерилизуется под давлением 0,5 и 1 атм.

Время и температуру автоклавирования питательной среды определяют в зависимости от термостабильности или термолабильности в составе компонентов. Молоко или желатин, содержащие в составе сахар, витамины

скоропортящиеся субстраты (пивной купорос, соки, автолизаты дрожжей), стерилизуют при 0,5 атм. в течение 15-30 мин. Мясопептонные среды стерилизуют при 1,0 атм. в течение 20 мин. Стерилизация различных порошков (например, талька), некоторых жидкостей (глицерин, вазелиновое масло) в автоклаве несколько затруднена, поэтому их требуют в сушильных шкафах стерилизовать при 160°C в течение 2 часов или 1 часа при 170°C. При этом толщина масла или порошка в емкости не должна превышать 1,5 см. После автоклавирования среду помещают в термостат при 30°C на 2-3 дня для проверки стерильности среды.

Тиндализация и пастеризация. Тиндализация или двойная стерилизация была предложена Тиндалом в 1877 году. Этот метод применяют для стерилизации питательных сред со скоропортящимся содержимым при температуре выше 100°C. Тиндализация проводится в автоклаве или аппарате Кокса с использованием проходящего пара. Среду нагревают несколько раз по 10-15 минут. Между плавками ставят при 30°C на 8-12 часов в термостат для роста спор. Лекарственные среды, устойчивые к температуре 100°C, стерилизуют при 60 - 80°C через каждые 8-12 часов в течение 4-5 дней подряд.

Однократный нагрев при температуре ниже 100°C называется методом пастеризации. Этот метод был предложен Пастером и предназначен для уничтожения бесспоровых микроорганизмов. Было замечено, что во многих случаях этот метод не обеспечивает полной стерилизации. Пастеризацию проводят при 60-80°C в течение 10-30 минут и очень быстро охлаждают до 10-11°C. Этот метод используется в пищевой промышленности для стерилизации молока, фруктовых соков, вина, пива и др.

Стерилизация с помощью фильтрации. Фильтрация стерилизует ряд высокотемпературных быстроразлагающихся и летучих питательных сред и культуральных жидкостей

микроорганизмов, таких как витамины, аминокислоты (цистеин и цистин), белки, углеводы, антибиотики. Жидкости пропускают через фильтры, состоящие из мелкопористых материалов, а клетки микроорганизмов пропускают через фильтры, состоящие из легко адсорбирующих материалов: асбеста, целлюлозы, фарфора, каолина и др.

Поры стерилизующих фильтров теоретически не превышают 0,20 мкм. Наиболее широко применяемыми в практике микробиологии фильтрами являются мембранные фильтры, которые применяются при различных стерилизациях и фильтрациях в зависимости от размеров пор.

В фильтре Зейтс используются диски из асбеста и целлюлозы. Им присваиваются разные индексы в зависимости от размера взятки.

Мембранные фильтры стерилизуют при 15 атм. в течение 15 минут или кипячением.

Стерилизовать стеклянную посуду. Стеклянную посуду, используемую в лаборатории, стерилизуют в течение 1-3 часов при температуре не выше 180°C с использованием горячего сухого воздуха. При этой температуре погибают вегетативные клетки и споры микроорганизма.

Стерилизацию проводят в специальных стерилизаторах или сушильных шкафах, автоматически поддерживающих температуру, а также при заданной температуре (табл. 2).

Простерилизованную стеклянную посуду перед стерилизацией следует тщательно вымыть, а после стерилизации обернуть бумагой для предотвращения повторного заражения микроорганизмами. Затем стерилизованные банки помещают в сушильные шкафы, чтобы поток воздуха хорошо циркулировал, когда они не герметичны.

Не следует открывать сушильный шкаф, пока температура внутри после стерилизации не упадет с 80°C, иначе стеклянная посуда может треснуть.

Таблица 2

**Необходимая температура для стерилизации
стеклянной посуды**

Температура, °C	Время (мин)
140	180
150	150
160	120
170	60

Стерилизация оборудования. Мелкие металлические инструменты - петли, иглы, плоскогубцы, ножи, шпатели перед использованием стерилизуют огнем. Кроме того, перед посевом культуры обжигают на коротком огне стеклянную и стеклянную посуду, стеклянные палочки и шпатели, фарфоровые кастрюли и сковородки, горлышки пробирок, пробирки, флаконы, а также ватные тампоны. При пожаре погибают вегетативные клетки и споры микроорганизмов.

Шприцы стерилизуют при 160°C со сбором или без сбора сухим жаром. В первом случае время стерилизации составляет 75 минут, а во втором - 60 минут. Собранный шприц стерилизуют в пробирке с иглой, при этом вату закрывают пробкой, а несобранный шприц заворачивают в бумагу или ткань в автоклаве при 1 атм. в течение 15-20 минут. Обычно рекомендуется стерилизовать их при сборе, иначе они могут быть контаминированы микроорганизмом.

Стерилизация с использованием газов. С помощью газов стерилизуют различные стеклянные приборы, оптические и радиоэлектронные приборы, а также термолабильные пластмассы, например центрифужные пробирки. Смесь газов со спорицидным действием применяют для стерилизации с помощью газов. К ним относятся: этиленоксид, бромистый метил, пропиленоксид, формальдегид, глутаровый альдегид, бета-пропиолактон, озон. Газовая стерилизация проводится в

специальных герметичных контейнерах. Простерилизованные предметы помещают в специальную камеру в закрытом, завернутом состоянии, как будто стерилизуют в автоклаве или сушильных шкафах. Процесс стерилизации с использованием газов следует проводить с учетом уровня их токсичности.

Радиационная стерилизация. При стерилизации зданий, приборов, ряда медицинских учреждений (операционных), стерилизации пищевых продуктов применяют: лучи радиоактивных элементов типа инфракрасного, ультрафиолетового, рентгеновского, а-, б-, г-. Во многих случаях ультрафиолетовое излучение используется в микробиологической практике. Интенсивность этого света измеряется партиями. Величина воздействия УФ-излучения на различные микроорганизмы (кроме спор) составляет 5 мкб/см².

Ход работы:

1. Подготовка к стерилизации различных емкостей и сред, и стерилизуемых предметов;
2. Нарежьте фольгу на полоски длиной 25-30 см и шириной 2-3 см.
3. Заверните ее в присутствии преподавателя, используя кончик пипетки для подготовки к стерилизации, и накройте заднюю часть пипетки ватным тампоном с помощью препарирующего крючка.
4. Поставьте чашки Петри вверх дном на газету или лист бумаги (А4) и с помощью учителя заверните (в виде конфеты) и подготовьте к стерилизации.



Контрольные вопросы:

1. Какие инкубационные устройства используются в лаборатории микробиологии и каков принцип их работы?
2. Какие холодильники использовали?
3. Какие виды стерилизации существуют?

4. Рассчитать методы горячей стерилизации и их применение.

5. Как проводится автоклавная стерилизация?

6. Что такое холодная стерилизация и когда она применяется?

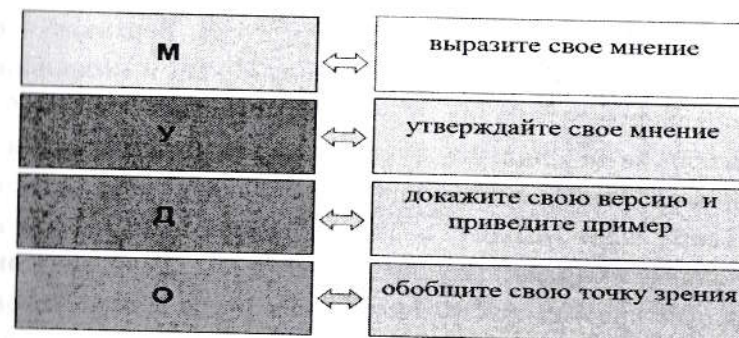
7. Какие газы используются при газовой стерилизации?

8. Какие лучи используются для стерилизации?

Метод "МУДО"

Цель технологии: Данная технология используется для закрепления пройденной темы. Делать личные выводы из идей, сравнивать и противопоставлять, усваивать информацию путем обобщения, а также формировать навыки самостоятельного творческого мышления.

Используйте эту технологию на лекциях, закреплении, задании вопросов, домашних заданий и анализе результатов практических занятий.



Задания:

1. Зачем нужна была стерилизация?
2. Почему не всегда возможно использовать оба вида стерилизации?
3. Перечислите области применения горячей стерилизации и объясните её значение.
4. Выскажите своё мнение о современных методах стерилизации.

Лабораторная работа №4

Тема: Изучение конструкции микроскопа МВР-1.

Цели курса: Ознакомиться с устройством биологического микроскопа и правилами эксплуатации.

Необходимое оборудование: Фальга, посуда, бактериологическая петля, различные красители (щелочной фуксин, генцианвиолет), автоклав, термостат, анаэроустат, посуда и покровные стекла, чашки Петри, пипетки разных размеров, электронная доска, световой микроскоп с цифровой камерой и т. д.

Теоретическая информация. Микроскоп состоит из механической и оптической частей. В механическую часть входят: столешница и штатив (рукоятка), закрепленный на тубусе (12-рисунок.) Препарат кладут на стол. Препарат можно стягивать с помощью зажимов и перемещать в горизонтальной плоскости с помощью двух винтов справа и слева. Кронштейн конденсора крепится к нижней части стола. Верхнюю часть штатива можно перемещать с помощью макро- и микровинта. Если повернуть эти болты по часовой стрелке, ручка тубуса опустится, если повернуть против часовой стрелки – поднимется. Один оборот микровинта толкает тубус на 0,1 мм. Революер снова входит в механическую часть и в нее вкручиваются линзы. Окуляр крепится к верхнему концу тубуса. Оптическая часть включает в себя осветительное устройство, объектив и окуляр. Осветительный прибор будет состоять из конденсора и зеркала. Зеркало имеет плоскую сторону с одной стороны и вогнутый вид с другой. Конденсор состоит из системы линз, собирающих параллельные лучи, идущие от источника света и отражающиеся в зеркале. Интенсивность пропускания света можно регулировать с помощью ирисовой диафрагмы. Под диафрагмой находится фланец для светофильтров. Конденсатор можно перемещать в вертикальном направлении с помощью специального винта.

При работе с конденсором используется только плоская сторона зеркала. Интенсивность пропускания света можно регулировать с помощью ирисовой диафрагмы. Под диафрагмой находится фланец для светофильтров. Конденсор можно перемещать в вертикальном направлении с помощью специального винта. При работе с конденсором используется только плоская сторона зеркала. Интенсивность пропускания света можно регулировать с помощью ирисовой диафрагмы. Под диафрагмой находится фланец для светофильтров. Конденсор можно перемещать в вертикальном направлении с помощью специального винта. При работе с конденсором используется только плоская сторона зеркала.

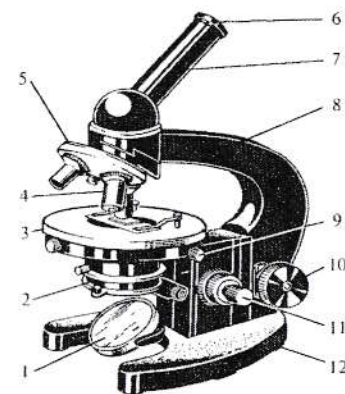


Рисунок 12. Микроскоп МВР-1: 1 - зеркало; 2 - конденсор; 3 - предметный столик; 4 - объектив; 5 - революер; 6 - окуляр; 7 - тубус; 8 - штатив; 9 - винт подъема конденсора; 10 - макровинт; 11 - микровинт; 12 - основание микроскопа.

Объектив состоит из системы линз, закрепленных на металлическом фланце, важнейшей из которых является внешняя (фронтальная) линза. Увеличение линзы зависит от ее фокусного расстояния и кривизны. Микроскоп МВР-1 имеет объективы с увеличением 8, 40 (сухое) и 90 (иммерсионное или масляное). В сухих линзах между передней линзой и объектом находится воздух, а в иммерсионных (масляных) линзах —

специальное масло, показатель преломления которого равен показателю преломления стеклянной линзы (1,5). В результате световые лучи не проходят через объект и масло. Иммерсионный объектив часто используется при наблюдении за микроорганизмами. Окуляр состоит из двух линз: верхняя – окуляр, нижняя – конденсорная линза. Между ними находится диафрагма в общем фланце. Окуляры различаются в зависимости от увеличения: 5х, 7х, 10х, 12х, Окуляры с 15-кратным и 20-кратным увеличением. Наиболее важным является способность микроскопа увеличивать и отображать. Чтобы найти общий уровень увеличения микроскопа, необходимо умножить увеличение объектива на увеличение окуляра. Например: если используется иммерсионный объектив (90х) и окуляр 7х, то общее увеличение будет 630 крат. Отражательная способность микроскопа — это наименьшее видимое расстояние между двумя точками в данном микроскопе. Это расстояние называется когнитивной дистанцией (d). Его величина зависит от длины волны света (λ), числа апертур объектива (A_1) и числа апертур конденсора (A_2).

$$d = \frac{\lambda}{A_1 + A_2}$$

Если $A_1 = A_2$,

$$d = \frac{\lambda}{2A}$$

Количество отверстий определяется по следующей формуле: $A = \sin u \times n$

u — полуугол света, попадающего в линзу;

n — показатель преломления среды между объективом и препаратом.

Если $u = 900$ и $n = 1,5$ (показатель преломления света иммерсионного масла), то $A = 1,5$. Если длина световых лучей λ

$= 600$ нм (0,6 мкм), то $d = 0,2$ мкм. Это означает, что оптическая сила светового микроскопа составляет 0,2 мкм. Если вместо света использовать ультрафиолет, то этот показатель можно уменьшить и так далее. Если абсолютное значение d мало, то чем больше мощность дисплея микроскопа, тем меньший объект можно увидеть.

Для наблюдения микроорганизмов под микроскопом в первую очередь готовят препарат. Приготовленные препараты готовят способами «сжатая капля», «висячая капля», «метод копирования», фиксированное окрашивание и так далее.

Дополнительные приборы для биологической микроскопии. Эти устройства позволяют максимально использовать все его возможности, упростить условия работы и значительно расширить область применения. В микробиологических лабораториях обычно используются следующие устройства:

1. Темнопольные кардиоидные и параболоидные конденсаторы.
2. Фазоконтрастные приборы KF -1, KF-4 и другие модели.
3. Бинокулярный прибор, приближающий наблюдение под микроскопом к условиям естественного зрения.
4. Светильники ОI-7, ОI-19 обеспечивают оптимальное и стабильное освещение. Интенсивность света регулируется реостатом.
5. Окуляр-микрометр и объект-микрометр для измерения микроскопических объектов.
6. Нагревательный столик, установленный вместо предметного столика микроскопа, используется для поддержания постоянной температуры и длительного наблюдения за живыми микроорганизмами.
7. Чертежный аппарат для нанесения препарата. Его можно использовать для одновременного просмотра изображения предмета и листа бумаги на столе возле

микроскопа и рисования контура предмета на бумаге.

8. Цветные, нейтральные и тепловые светофильтры, расположенные между источником света и микроскопом. Они используются в специальных методах наблюдения под микроскопом.

9. Микроны моделей MFN-1, MFN-3 и др. для визуализации микроскопических объектов.

10. Микроструктура для нейтрафера микрокинетика применяется совместно с фазово-контрастной микроскопией для изучения динамики развития и размножения микроорганизмов, воздействия на них различных факторов и многих других вопросов.

Темнопольная микроскопия. Микроскопия в темном поле зрения основана на явлении дифракции света при сильном боковом освещении очень мелких частиц (эффект Тиндала) в жидкости. Это делается под биологическим микроскопом с использованием параболоидного или кардиод-конденсора, заменяющего обычный конденсор (13-рисунок а, б).

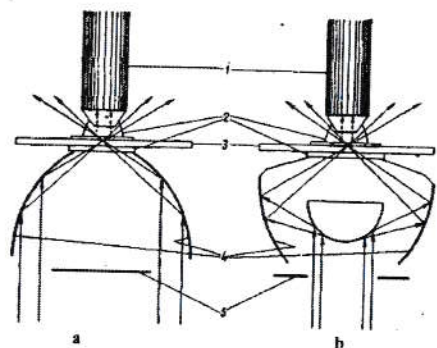


Рисунок 13. Рассеяние света в конденсорах темного поля.

а—параболоидконденсор; б—кардиоидный конденсор; 1—цель;
2—иммерсионное масло; 3—подготовка; 4—зеркальная поверхность;
5—диафрагма.

В центре параболоид-конденсора находится внутренняя зеркальная поверхность, улавливающая тьму и отражающая

свет, улавливающая центральные лучи света (14-рисунок). В кардиоконденсоре лучи возвращаются сначала от выпуклой поверхности, а затем от вогнутой. Линза принимает возвращающиеся от объекта лучи, которые создают четкое светонизлучающее изображение микробных клеток и других частиц, присутствующих на темном фоне.

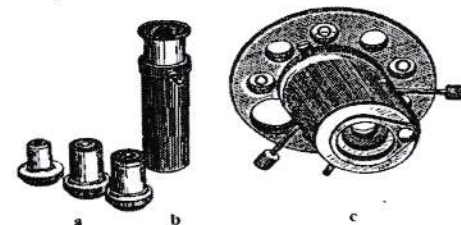


Рисунок 14. Фазово-контрастный прибор; а - фазовые линзы; б - вспомогательный микроскоп; с - фазовый конденсор.

Фазово-контрастная микроскопия. Микроскопия в этом методе основана на преобразовании изменений фазы, возникающих при прохождении световых лучей через объекты, называемые фазовыми (прозрачными), в изменения амплитуды, которые могут быть восприняты глазом. С помощью фазово-контрастного прибора (рис. 14) световая волна, прошедшая через предмет, преобразуется в амплитуду изменения, и прозрачные предметы можно увидеть под микроскопом. В этом случае их изображение будет иметь высокую контрастность, которая может быть как положительной, так и отрицательной. Положительный фазовый контраст относится к черному изображению объекта в светлом поле зрения, а отрицательный фазовый контраст относится к светлому изображению объекта на темном фоне (Рисунок 15).

Для фазово-контрастной микроскопии используют простой микроскоп и дополнительный фазово-контрастный прибор KF-1 или KF-4. В этот набор входят:

1. Фазокольцевые специальные линзы, меняющие фазу,

что уменьшает амплитуду световой волны. Перед фазовыми линзами имеется дополнительный буквенный индекс «F»: F-10, F-20, F-40 и FOI-90.

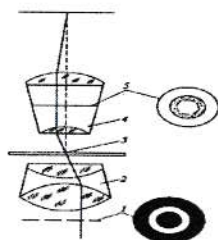


Рисунок 15. Схема светопропускания при использовании пространственно-контрастного прибора: 1-кольцевая диафрагма; 2-конденсор; 3-объект; 4-цель; 5-фазная пластина.

2. Фазовый конденсор с револьвером со специальной кольцевой диафрагмой для каждой линзы. Индексом «O» в ирисовой диафрагме отмечено отверстие для простого наблюдения за препаратом.

3. Вспомогательный микроскоп с малой лупой, у которого замена окуляра осуществляется при наблюдении за центрированием света.

В фазово-контрастной микроскопии используются лампы типа OI-7 или OI-19, схема формирования изображения приведена ниже (16-рисунок).

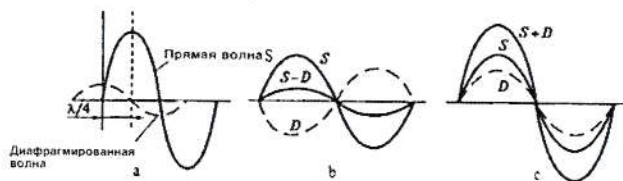


Рисунок 16. Схема, поясняющая принцип фазового контраста: а-фазовые сдвиги между α -дифрагированной (D) и прямой (S) волнами; б-темный контраст; в-контраст утечки.

Флуоресцентная (или флуоресцентная) микроскопия. Он основан на явлении фотолюминесценции. Люминесценция (lumen - свет) - облучение веществ после воздействия на них какого-либо источника энергии: ионизирующего излучения, лучей, пучков электронов. Фотолюминесценция имеет гораздо большую длину волны, чем возбужденный свет. Вот почему люминесценция стимулируется с помощью коротковолновых лучей. Если светящийся объект освещается цветом воздуха, то он излучает красный, желтый или зеленый свет. В результате получается цветное изображение объекта. Длина волны рассеянного света (цвет люминесценции) зависит от физико-химических свойств люминофора.

Наблюдается ориентировочное окрашивание первичного (индивидуального) объекта люминесценции, которое происходит после окрашивания вторичных (генерированных) препаратов специальными люминесцентными красителями-флуорохромами. Флуоресцентная микроскопия имеет ряд преимуществ перед обычными методами: «благодаря возможности изучения живых микроорганизмов и высокой степени контрастности их можно обнаружить даже в небольшом количестве в исследуемом материале». В лабораторной практике люминесцентная микроскопия используется для обнаружения и изучения многих микроорганизмов.

Электронная микроскопия. Этот метод позволяет наблюдать габаритные объекты, лежащие за пределами зрительного свойства светового микроскопа (0,2 мкм). Электронная микроскопия позволяет изучать тонкие структуры вирусов, различных микроорганизмов, макромолекулярных структур и других субмикроскопических объектов.

Свет, излучаемый в таких микроскопах, преобразуется в поток электронов с определенными скоростями 0,005 нм, т. е. в

100 000 раз короче длины волны видимого света. Высокая 0,1-0,2 нм индикация электронного микроскопа позволяет получить общее полезное увеличение до 1 000 000 раз.

Кроме «осветительного» типа оборудования применяют сканирующие электронные микроскопы, которые отображают рельефное изображение поверхности объекта. Дисплейные свойства этих приборов значительно ниже, чем у электронных микроскопов «осветительного» типа.

Ход работы:

Работа с любым микроскопом предполагает выбор правильного поля зрения и света препарата и наблюдение за ним под микроскопом с разными объективами. Освещение может быть естественным (дневной свет) или искусственным, с использованием специальных источников света, например ламп ОI-7.

Наблюдение за препаратами на иммерсионном объективе:

1. Аккуратно капните каплю иммерсионного масла на приготовленную окрашенную смесь и положите препарат на стол;

2. Револьвер должен быть повернут к иммерсионному объективу - 90;

3. Опускайте тубус микроскопа до тех пор, пока он не погрузится в каплю объективного масла;

4. Необходимо определить фокус ориентации с помощью макрометрического винта;

5. С помощью микрометрического винта вращают его только на один предел вращения и производят окончательное уточнение изображения препарата.

Линза не должна касаться препарата, так как в этом случае может разбиться препарат или фронтальная линза (свободное расстояние иммерсионной линзы 0,1-1 мм).

По окончании протереть иммерсионную линзу

микроскопа толуолом и микроскоп простаивает, т.е. револьвер нужно переставить на сухую линзу - 8.

Правила работы с методом фазово-контрастной микроскопии:

1. Установите на микроскоп фазовый конденсор и совместимую фазовую линзу. Установите револьвер конденсора на «0».

2. Поместите препарат на стакан.

3. Свет должен быть подобран таким образом, чтобы четкое изображение провода электрической лампы располагалось на полностью открытой поверхности ирисовой диафрагмы конденсора.

4. Заменить окуляр на вспомогательный микроскоп MIR-4 и заменить его окуляр, фокусируя фазовое кольцо объектива до получения четкого черно-серого изображения.

5. Отрегулировав диафрагму под фазовую линзу, в поле зрения появится негерметичное кольцо диафрагмы.

6. Полностью отрегулируйте утечку и темные кольца с помощью центробежного винта конденсора.

7. Заменить вспомогательный микроскоп окуляром и наблюдать препарат под микроскопом.

8. Перепроверьте центрифугирование кольцевой диафрагмы с фазовым кольцом при замене объектива или препарата. Правильное выполнение всех условий обеспечивает высокую контрастность изображения.

Метод микроскопии темного поля:

1. Заменить в микроскопе простой конденсор на темное поле (параболоидный или кардиоконденсор).

2. Для создания оптически однородной среды на верхнюю линзу темнопольного конденсора следует добавить 1 каплю дистиллированной воды или иммерсионного масла. Поднимайте конденсор до тех пор, пока капля воды или масла не столкнется со стеклянной посудой.

3. Создать достаточно мощный и стабильный источник света (например, светильник ОI-7) и произвести точную настройку системы освещения микроскопа.

Ошибки, возникающие при микроскопическом наблюдении в темном месте, связаны с наличием пузырьков воздуха между конденсором и окном прибора, перекосом конденсора и т. д.

Метод флуоресцентной микроскопии. При обычной работе объект обычно обостряется за счет света, падающего через линзу. В нем используются воздушные светофильтры FS-1 (2 мм), FS-2 (4 мм) и желтый светофильтр J-18 для защиты глаз.

При работе с микроскопом ML-2 необходимо:

1) включить вилку блока питания микроскопа в сеть;
2) поверните ручку регулятора напряжения на красную точку по часовой стрелке;

3) поверните тумблер на лицевой стороне блока питания в положение «включено» и нажмите кнопку подсветки микроскопа; если лампа не загорается, поверните ручку регулятора напряжения на несколько мм по часовой стрелке и снова нажмите кнопку (кнопка не будет нажата в течение 2-3 секунд);

4) рукоятку регулятора рабочего тока довести до отметки 4А после включения светильника; препарат можно наблюдать через 10 мин после включения лампы микроскопа. Флуоресцентную микроскопию проводят в темной комнате.

Методы приготовления препаратов для темнопольной, фазово-контрастной и люминесцентной микроскопии. Нативные препараты (растертые капли и др.) готовят для темнопольной микроскопии; Его наблюдают под микроскопом с помощью специальных иммерсионных объективов с 40-кратной или ирисовой диафрагмой, позволяющих регулировать числовую апертуру от 1,25 до 0,85. Толщина стекла не должна превышать 1-1,5 мм, а толщина покровного

стекла не должна превышать 0,15-0,2.

Для люминесцентной микроскопии на стекле прибора готовят смазки или нативные препараты, которые окрашивают специальными люминесцентными красками; желтый акридин, оранжевый акридин, ауромин, корифосфин. Флуоресцентное масло используется при работе с иммерсионным объективом. Препараты, приготовленные для наблюдения под электронным микроскопом, имеют ряд особенностей. Препараты готовят на специальных пленках-подложках (пленках-подложках), поскольку стекло непроницаемо для электронов. Исследуемый объект максимально очищают от лишних примесей и укладывают на пленку-основу, которая размещается примерно на основной металлической сетке.

Для наблюдения микроорганизмов под микроскопом препараты готовят разными способами: раздавленная капля, висячая капля, копирование, фиксированное окрашивание и т. д.



Контрольные вопросы:

1. Объясните, из каких частей состоит микроскоп?
2. Какие типы микроскопов доступны?
3. Какие существуют методы приготовления препаратов для темнопольной, пространственно-контрастной и люминесцентной микроскопии?
4. Как можно рассчитать увеличение микроскопа?
5. Каково назначение электронной микроскопии?
6. Наконечник для темного поля, пространственного контраста и флуоресцентной микроскопии
7. Какие существуют способы приготовления лекарств?
8. Каково назначение флуоресцентной микроскопии?
9. Что такое иммерсионная система?

Технологии, используемые для закрепления знаний учащихся: "Метод мозговой атаки"

Цель технологии: Данная технология позволяет участникам быстро соображать.

Это помогает развивать отзывчивость. Получении информации, обобщение, а также навыки самостоятельного творческого мышления. Данную технологию рекомендуется использовать на лекциях, на одкреплении, задании вопросов, выполнении домашних заданий и анализе результатов практических занятий.

Задания:

1. Каким был первый созданный микроскоп и его устройство?
2. Что такое оптическая часть микроскопа?
3. Из каких механических частей состоит микроскоп?
4. Что такое видимость микроскопа и как она определяется?
5. Как определяется увеличение микроскопа?

Лабораторная работа №5

Тема: Приготовление живых препаратов микроорганизмов и их наблюдение под микроскопом

Цель работы: Изучение препарата живых организмов микроорганизмов и их наблюдение под микроскопом.

Необходимое оборудование и инструменты: микроскоп, спирт, ванночка-лестница (обзан), посуда и покровные стекла, бактериальная петля, штатив для пробирок, краски, иммерсионное масло, реактивы, применяемые под микроскопом и водяной трубкой, электронная доска, световая микроскопия с цифровой камерой и др.

Теоретическая информация

Препарат готовят из культуры бактерий определенного возраста, выращенной на жидкой или агаризованной среде. Разработано множество рецептов приготовления питательных сред, наиболее удобной и простой в приготовлении из них является питательная среда, условно называемая пептонной: гр/на л водопроводной воды, пептон - 10, сахара или глюкоза - 2, K_2NO_4 - 0,5, $MgSO_4$ - 0,5, NaCl - 0,5 добавляют для получения плотной питательной среды 15-20 г агар-агара. После нагревания и оттаивания его разливают в питательные пробирки и стерилизуют, сгибают, в результате чего получается «кривой агар». Если на искривленную поверхность агара высаживают бактериальную культуру и выращивать в определенных условиях, то ее используют при приготовлении препарата из видимых разросшихся бактерий.

При работе с микроорганизмами рабочее место должно быть чистым, без посторонних предметов, а у каждого обучающегося должно быть постоянное рабочее место. Каждый учащийся должен подготовить вышеперечисленные инструменты и оборудование на рабочем месте до начала занятия.

Ход работы:

Приготовление препарата осуществляется следующим образом:

1. На стеклянную палочку в центр стакана капают 1-2 капли воды;
2. С биомассы исследуемой культуры бактериальной петлей удаляют каплю воды и перемешивают (рисунок 17);
3. Избыток биомассы в бактериальной петле стерилизуют сжиганием в пламени спиртовки;
4. По образовавшемуся слабому помутнению окно крышки аккуратно закрывают;

5. После того, как окно крышки закрыто, лишняя вода, выходящая вокруг него, пропитывается фильтровальной бумагой.

6. Затем на покровное стекло капают каплю иммерсионного масла и наблюдают под микроскопом.

Правила работы с микроскопом:

1. Студент ставит микроскоп перпендикулярно себе;
2. С помощью зеркала и ирисовой диафрагмы конденсора находят свет при дневном свете или с помощью специальных ламп, например ОИ-19;

3. К препарату добавляют каплю иммерсионного масла и помещают на столик микроскопа;

4. Объектив 90х (иммерсионная линза) на revolverе микроскопа приспособлен для наблюдения за препаратом, линза объектива погружена в масло при взгляде сбоку;

5. Глядя в окуляр, объект находится с помощью макровинта;

6. Для достижения четкого обзора используется микровинт.

7. Микровинт используется очень осторожно - не крутите по часовой стрелке или против часовой стрелки более чем на 1-2,5 оборота.

8. Освещенность препарата уменьшают или увеличивают перемещением конденсора в вертикальном направлении.

Окружность диаметром 3-4 см, аналогичную полю зрения, чертят в специальном альбоме, хранящемся для лабораторных работ. Рисует картину изучаемых микроорганизмов, обращает особое внимание на их размеры и форму, записывает необходимую информацию.

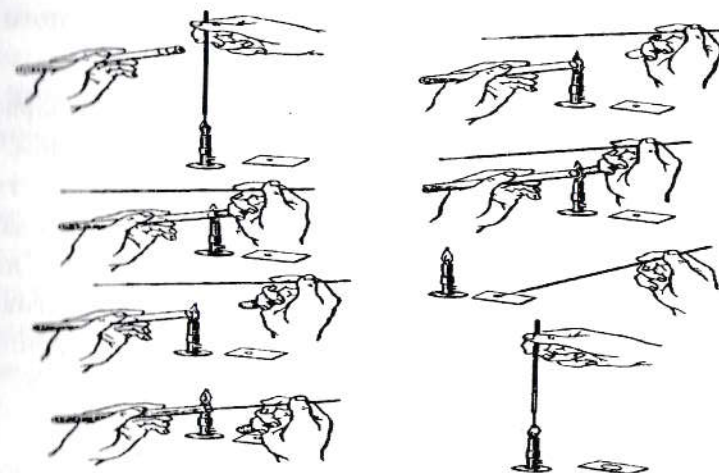


Рисунок 17. Отбор проб бактериальной петлей и приготовление живого препарата.

По окончании работы масло в объективе очищают (протирают ватным тампоном, смоченным в толуоле), закрепляют малую линзу в revolverе, тубус и конденсор опускают и помещают в специальное место, где микроскоп и хранятся другие учебные пособия.



Контрольные вопросы:

1. Препарат какого микроорганизма используют для приготовления живого препарата микроорганизма?
2. Как приготовить живой препарат?
3. Объясните правила работы под микроскопом.
4. Объясните, почему при приготовлении живого лекарства используется покрытие.
5. Как найти объект?
6. Как осуществляется освещение при недостатке света?
7. Объясните, какая работа будет выполняться на микроскопе после работы?

Лабораторная работа №6

Тема: Приготовление фиксированного окрашенного препарата.

Цель работы: Приготовление фиксированного препарата микроорганизмов и изучение наблюдение под микроскопом.

Необходимое оборудование и инструменты: микроскоп, спиртовка, лестница и ванночка (обзан), посуда и покровные стекла, бактериальная петля, штатив для пробирок, краски, иммерсионное масло, реактивы, применяемые под микроскопом и колба с водой, электронная доска, световой микроскоп с цифровой камерой и др.

Теоретическая информация

Препарат готовят из культур бактерий определенного возраста, выращенных на жидкой или агаризованной среде. Микроорганизмы, используемые при приготовлении препарата, выработали множество рецептов приготовления питательных сред, из которых наиболее удобной и простой в приготовлении является питательная среда, условно называемая пептонной: гр./на л водопроводной воды, пептон - 10, сахара или глюкоза - 2, K_2NPO_4 - 0,5, $MgSO_4$ - 0,5, NaCl - 0,5 к 15-20 г агара для получения твердой среды. После нагревания и оттаивании его разливают в питательные пробирки и стерилизуют, сгибают, в результате чего получается «кривой агар». Если на искривленную поверхность агара высаживают бактериальную культуру и выращивать в определенных условиях, то ее используют при приготовлении препарата из видимых разросшихся бактерий

При работе с микроорганизмами рабочее место должно быть чистым, без посторонних предметов, а у каждого обучающегося должно быть постоянное рабочее место. Каждый ученик должен подготовить необходимые инструменты и материалы для рабочего места до начала урока.

Ход работы:

Подготовку к фасетной окраске микроорганизмов проводят в следующем порядке:

Приготовление мазка. Каплю воды, стекающую на стекло прибора, слегка добавляют к биомассе исследуемой культуры и перемешивают бактериальной петлей (18-рисунок). Излишняя биомасса сжигается. Образовавшееся слабое помутнение распределяют по стеклу в виде круга диаметром 2 см, сушат на воздухе (иногда вблизи пламени) и смазывают. В правильно приготовленной смазке бактерии отделяются и образуют тонкий слой (рис. 18, А и Б).

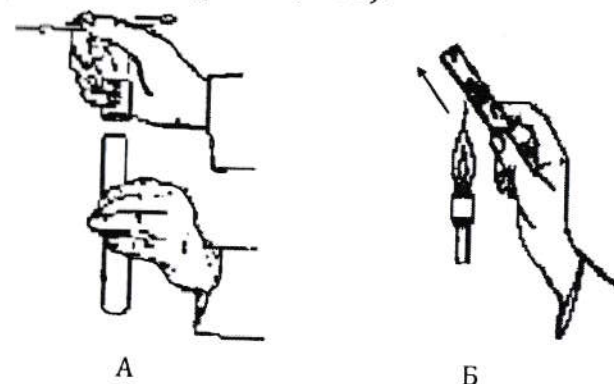


Рисунок 18. Приготовление препарата из чистой культуры в пробирке. А - удержание бактериальной культуры пальцами левой руки и открытие пробки пробирки перед пламенем пальцем правой руки; Б - сушка препарата.

Фиксация осуществляется с помощью высокой температуры (фламбензинг) или химическим путем. При первом способе препарат закрепляют трехкратным пропусканием пламени спиртовой или газовой горелки, ориентируясь на пламя. При фиксации клетки умирают и хорошо прилипают к стеклу, что облегчает окрашивание, чем живую клетку.

Окрашивание. Препарат окрашивают кислыми или щелочными анилиновыми красителями. Кислые красители содержат хромофоры (красящие ионы) - анионы, а щелочи -

катионы. К щелочным красителям относятся: метиленовый синий, щелочной фуксин, чернильная краска горечавка и другие. Если краситель предварительно замочить в фильтровальной бумаге и высушить, красить будет легче. После окрашивания в течение одной-двух минут краску промывают водопроводной водой, остатки воды пропитывают фильтровальной бумагой, а затем исследуют под микроскопом.

Микроскопическое исследование препарата. Ученик ставит микроскоп перпендикулярно себе. С помощью зеркала и ирисовой диафрагмы конденсора можно получить свет при дневном свете или с помощью специальных светильников, например ОI-19. К препарату добавляют каплю иммерсионного масла и помещают на столик микроскопа. Объектив 90х (иммерсионная линза) на revolvere микроскопа приспособлен для наблюдения за препаратом, линза объектива погружена в масло при взгляде сбоку. Глядя в окуляр, объект находят с помощью макрометра. Микроволновая печь используется для достижения четкого обзора. Микромотором пользуются очень осторожно - его нельзя проворачивать по часовой стрелке или против часовой стрелки более чем на 1-2,5 оборота. Освещенность препарата уменьшают или увеличивают перемещением конденсора в вертикальном направлении.

Из микробиологии в специальном альбоме, хранящемся для лабораторных занятий, нарисуйте круг диаметром 3-4 см, аналогичный полю зрения. Он рисует изучаемые клетки, уделяет особое внимание их размеру и форме, записывает необходимую информацию.

По окончании работы масло в объективе очищают (протирают ватным тампоном, смоченным в толуоле), закрепляют малую линзу в revolvere, тубус и конденсор опускают и помещают в специальное место, где микроскоп и хранятся другие учебные пособия.



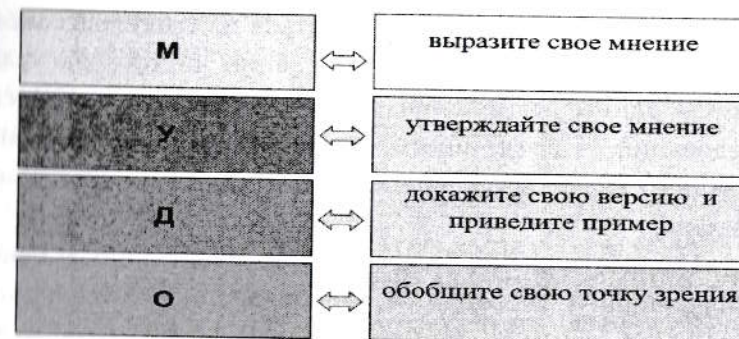
Контрольные вопросы:

1. Опишите приготовление мази.
2. Какие виды фиксации доступны?
3. Какие красители используются для окрашивания лекарств?
4. Как рассмотреть препарат под микроскопом?
5. Какие виды фиксации существуют?
6. Какие красители относятся к щелочным анилиновым красителям, применяемым при окрашивании лекарственных средств?
7. Как избавиться от лишних микроорганизмов, оставшихся в бактериологическом контуре?

Технологии, используемые для закрепления знаний учащихся. Метод «МУДО»

Цель технологии: Данная технология используется для повторения и закрепления пройденной темы. Делать личные выводы из идей, сравнивать и противопоставлять, усваивать информацию путём обобщения, а также формировать навыки самостоятельного творческого мышления.

Используйте эту технологию на лекциях, подкреплении, задании вопросов, домашних заданий и анализе результатов практических занятий.



1. Почему сначала нагревают бактериологическую петлю?
2. Почему смазка должна быть жидкой и иметь ровную поверхность?
3. Почему препарат фиксируется?

Лабораторная работа №7

Тема: Приготовление элективной культуры сенных бацилл и наблюдение под микроскопом.

Цель работы: Приготовление чистого экстракта сенных палочек и наблюдение сенных палочек под микроскопом

Необходимое оборудование и реагенты: сено сухое, весы, одна большая и несколько маленьких пробирок, электрическая плитка, мел белый, термостат, микроскоп, кедровое масло, посуда, покровное стекло, бактериальная петля, туберкулёзная карболовая фуксия и цинковые красители, фильтровальная бумага, 1,2,3 и 4-х дневная элективная культура сенной палочки, 5% хромовая кислота, спиртовка, 5% серная кислота, термостат, электронная доска, световой микроскоп с цифровой камерой и др.

Теоретическая информация

Чистая экстракция (элективная культура) – это выделение микроорганизмов одного вида из набора микробов. Это позволяет одному виду развиваться из смеси нескольких различных микроорганизмов. Выделение чистого экстракта является одним из основных этапов микробиологических исследований. Перед приготовлением чистого экстракта необходимо изучить условия жизни и развития испытуемого организма.

Для приготовления чистого экстракта сенных бацилл (*Basillus subtilis*) необходимы аэробные (оксигенированные) условия. Так как эти бациллы являются гетеротрофными, также должно быть достаточное количество органических

продуктов питания. В таких условиях большинству микроорганизмов будет гораздо комфортнее жить и расти. Споры сенной палочки сохраняют свою жизнедеятельность даже при кипячении в течение 2 часов. Однако при кипячении раствора погибают все неспорообразующие бактерии.

Ход работы:

Чистый экстракт сенных бацилл готовят следующим образом:

1. 10–15 г измельченного сухого сена помещают в водную колбу объемом 200–300 мл и кипятят 30 мин.

2. Для нейтрализации смеси добавляют 1–2 г измельченного мела. При кипячении смеси органические вещества в сене растворяются и становятся пищей для проросших бацилл.

3. Затем кипяченую жидкость разливают в 3 чистые колбы толщиной 1–2 см.

4. Горлышки колб закрывают ватным тампоном и выдерживают в термостате при температуре +30°C в течение 1–4 суток, из которых готовят препарат и исследуют под микроскопом. Оставшаяся в колбе солома будет содержать споры сенной палочки.

5. Препарат готовят методом суспензии или растолченных капель, беря по капле сеного отвара в стерилизованную бактериальную петлю, выдерживая сутки в термостате.

6. При наблюдении этого препарата под микроскопом видны подвижные бациллы, растущие из спор. Все их тело будет покрыто крапивницей.

После двух суток хранения сена в результате уменьшения воздуха и недостатка в нем питательных веществ подвижные бациллы покидают улей, становятся неподвижными и начинают быстро делиться. В результате деления бацилл образуются колонии, каждая клетка выделяет из себя слизь.

Колония этих слизистых бактерий называется зооглеей. Зооглея находится в виде тонкой пленки на поверхности жидкости. Для просмотра бацилл в зооглее необходимо сделать следующее:

1. Для этого с помощью бактериальной петли небольшое количество пленки на поверхности жидкости натирают на предметное стекло и высушивают на открытом воздухе.

2. Высушенное лекарство фиксируют, затем окрашивают фуксином или цинком и наблюдают через линзы микроскопа с увеличением 8х и 40х. При этом в препарате появляются соединенные между собой нитевидные клетки.

3. Затем готовят и фиксируют мазь из культуры сенных палочек, хранившуюся несколько дней, прикапывают 5%-ным раствором хромовой кислоты и окрашивают в течение 5 минут.

4. Хромовую кислоту смывают водой, затем к препарату добавляют каплю красителя силкарболовой фуксии и выдерживают спирт на пламени спиртовки 5 мин для испарения красителя.

5. При этом краска не должна высыхать, если она высыхает, краску добавляют повторно.

6. Затем краситель в препарате смывается водой, добавляется 5% H_2SO_4 , через 10-15 секунд смывается кислота.

7. Затем к препарату добавляют 2-3 капли Люффера цинка, а через 2 минуты также смывают.

8. Оставшиеся капли воды в препарате пропитывают фильтровальной бумагой.

На приготовленную таким образом заготовку капают каплю кедрового масла и исследуют под микроскопом в сухой и иммерсионной системах. При этом споры в препарате розовые, а вегетативные клетки окрашиваются воздухом.

2 Контрольные вопросы:

1. Что такое чистая экстракция?
2. Объясните, как получить элективную культуру сенных бацилл?
3. Во что превращаются сенные бациллы после определенного периода роста?
4. Что такое зоолия и как она выглядит в данном случае?
5. Какие виды имеются спор?
6. Какие условия необходимо для оптимальной размножение сенных бацилл?

Лабораторная работа № 8

Тема: Изучение морфологического строения палочковидных бактерий.

Цель работы: Наблюдение за морфологическим строением бактерий под микроскопом.

Необходимое оборудование и реагенты: термостат, микроскоп, кедровое масло, стекло, покровное стекло, культура палочковидных бактерий, бактериальная петля, фуксин, фильтровальная бумага, спиртовка, толуол, краска горечавки, пропитанная фильтровальной бумагой, электронная доска, световой микроскоп с цифровой камерой и др.

Теоретическая информация

Форма прокариотических организмов бывает палочковидной, шаровидной, изогнутой, скрученной и т.д. Обычно их называют одноклеточными палочковидными бактериями (бактерия — греч. палочка). Цилиндрические прямые стержни распространены. Они представляют собой неспорообразующие палочки и представляют собой настоящие бактерии (зубактерии), например, рода *Pseudomonas*, распространенного в почве. Одним из характерных

представителей спорообразующих организмов являются палочки рода *Bacillus*. В водоемах, богатых органикой и другими субстратами, встречаются патогенные спирально закрученные палочки - вибрионы, спирали и спирохеты. Бактерии, бациллы, вибрионы и спироулина имеют «твердую» клеточную стенку. Поэтому форма их клеток не меняется, она твердая, жесткая. Спирохеты, напротив, имеет уникальную форму и размер, строение и среду обитания. Эти организмы тоже одноклеточные, но не жесткие, меняющие форму. Степень закручивания спирохет меняется во время движения.

Ход работы:

Для ознакомления с палочковидными бактериями, спиралями и спирохетами готовят окрашенный препарат, фиксированный из следующих микроорганизмов:

1. *Pseudomonas* sp. - тонкие 0,3-0,4x3-5 мкм, без одиночных спор, прямые палочки. Пептонный агар (РА) растет в срединной плоскости, бесцветный, блестящий, по полосе плоский, цвет среды окрашен в сине-зеленый цвет. Культура образует в воде легкую эмульсию. Отдельно от почвы.

2. В почве, воде, растительных остатках и других субстратах встречаются также известные, как сальные палочки *Bac. subtilis*. Его средний размер 0,6-0,7x3-5 мкм, это спорообразующая палочка. РА имеет характерный вид при выращивании вдоль бруса - плоский, морщинистый, матовый. Сначала он окрашен в бесцветный цвет, затем в розовый, темно-коричневый или темно-черный. Образует твердую эмульсию.

3. *Bac. Bacilla*, распространенный в почве в виде крупных палочек. мегатерий (от греческих слов: mega - большой, teras - животное). Представляет собой спорообразующую палочку шириной 1,5 мкм и длиной 2-5 мкм. Штрихи в РА маслянистый, блестящий, слегка выпуклый, светло-желтого цвета, легко эмульгируется в воде.

4. Если в стеклянный стакан обычной кипяченой воды объемом 0,5 л налить вареные яичные желтки и выдержать 7-10 дней при температуре +2 8-30°C, то жидкость помутнеет и на ней образуется пленка. В жидкости в стакане видны спирали рода *Spirillum*, закрученные размером 1,5-2x30-70 мкм. В фиксированных окрашенных препаратах можно увидеть 3-4 складчатых зернистых клетки.

5. Для знакомства с скрученными, нажегообразными палочковидными стержнями готовят препарат из зубного налета. Спирохеты хорошо видны, особенно в препаратах, изготовленных из больных, кариозных зубов. Для приготовления препарата зубочисткой берется зубная паста и готовится мазок. Хорошо фиксируют в пламени, охлаждают и окрашивают щелочным фуксином через фильтровальную бумагу в течение 2 мин. При осмотре под микроскопом в поле зрения можно увидеть различные микроорганизмы полости рта, в том числе: зубную спирохету с очень тонкой шириной 0,3 мкм, длиной 10-15 мкм, с различными торсиями. Они принадлежат к роду *Treponema* семейства *Spirochaetaceae*.

Препараты всех бактерий и микроорганизмов просматриваются через иммерсионный объектив, в альбоме рисуются фотографии, под ними пишется название. Работу завершают протиранием объектива 90-микроскопа толуолом, смоченным в вате, остановкой, аккуратной укладкой в шкаф и уборка своего рабочего места. Эти правила всегда соблюдаются на уроках микробиологии.



Контрольные вопросы:

1. Какие виды палочковидных бактерий существуют?
2. Как называются не спорообразующие палочковидные бактерии?
3. Как называются спорообразующие палочковидные бактерии?

4. Как можно выделить спиральные бактерии из окружающей среды?

5. Что из перечисленного не относится к палочковидным спорообразующим бактериям?

6. Как можно выделить спиральные бактерии из природной среды?

7. Опишите крупные палочковидные бактерии, распространённые в почве.

8. Какие виды палочковидных бактерий участвуют в процессе разложения остатков живых организмов?

Лабораторная работа № 9

Тема: Изучение морфологического строения шаровидных бактерий.

Цель работы: Наблюдение за морфологическим строением бактерий под микроскопом.

Необходимое оборудование и реагенты: термостат, микроскоп, кедровое масло, стекло, покровное стекло, шаровидные культуры бактерий, бактериальная петля, фуксин, фильтровальная бумага, спиртовка, толуол, краска горчавка фиолетовая, пропитанная фильтровальной бумагой, электронная доска, световой микроскоп с цифровой камерой и др.

Теоретическая информация

Шаровидные бактерии — это кокки (coccus — греческое слово, означающее зерно или пузырек). Диаметр кокков составляет около 0,5–1 мкм. По плоскости деления клеток и сохранению взаимосвязи клеток после деления и, следовательно, по расположению клеток выделяют следующие морфологические группы.

Клетки микрококков шаровидные, диаметром 0,5–3,5 мкм. Они имеют свойство расщепляться в нескольких плоскостях при расщеплении. Встречается поодиночке или скоплениями,

образующими различные пучки. Они живут в воздухе, воде, почве, пище и других субстратах. Среди них часто встречаются цветные, пигментированные.

Клетки диплококков (diplos — лат. бинарный) делятся в одной плоскости и затем не расплываются, в результате чего образуются две сросшиеся клетки. Среди них возбудители таких заболеваний, как пневмония, гонорея, менингит.

Тетракокки (tetra — от латинского четыре слова) состоят из четырех клеток. Это происходит в результате деления клеток в двух плоскостях, перпендикулярных друг другу. Все известные представители тетракокков являются сапрофитами.

Стрептококки (streptus — греч. цепь) представляют собой цепочки клеток, образованные делением клеток в одной плоскости. Клетки имеют округлую или слегка вытянутую форму и имеют диаметр 2 мкм.

К стрептококкам относятся как сапрофиты, так и патогенные возбудители (гнойные язвы у человека и животных).

Сарцины (sarcina — лат. слияние) образуют кубовидные пакеты из 8 и более клеток. У него будет по 4 ячейки с каждой стороны. Эта форма образована делением клетки на три плоскости, перпендикулярные друг другу. Клетки имеют сферическую форму и диаметр 1,8–3,0 мкм. Различные виды сарсинов распространены в воздухе. Все они являются сапрофитами, возбудители которых еще не встречались.

Стафилококки (staphylo — от греч. виноградная гроздь) образуются в результате неравномерного деления клетки в разных плоскостях и напоминают по расположению грейпфрут. Клетка шаровидная, 0,8–1,5 мкм в диаметре. Стафилококки образуют гнойные поражения у человека и животных. Следует помнить, что упомянутые выше пучки шаровидных клеток, особенно пучки из 2–4, легко

распадаются на отдельные клетки, не будучи устойчивыми (рис. 19).

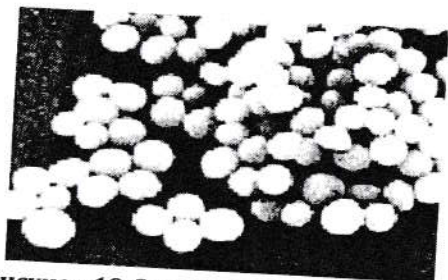


Рисунок 19. Золотистый стафилококк

Ход работы:

Для ознакомления с внешним видом шаровидных бактерий препарат готовят в виде «растертых капель» или фиксированных окрашенных пятен.

1. Для этого на стекло прибора капают каплю водопроводной воды. Затем его смешивают с небольшим количеством культуры исследуемого микроорганизма и накрывают покровным стеклом.

2. Препарат готовят путем смешивания культуры, выращенной на плотной питательной среде, с каплей воды с помощью бактериальной петли.

3. Культуру бактерий в жидкой питательной среде отбирают стерильной пипеткой, капают на предметное стекло и накрывают покровным стеклом. Так, во втором случае капать на стекло прибора капля воды не требуется.

4. Объем полученной капли должен быть настолько мал, чтобы при закрытом окошке крышки не было лишней жидкости. В противном случае избыток теряется при использовании фильтровальной бумаги.

5. Готовые препараты просматривают под микроскопом с использованием иммерсионного объектива.

Для исследования шаровидных бактерий готовят и исследуют препараты из следующих микроорганизмов:

1. Препараты микрококков готовят из культур *Micrococcus roseus* (розовых кокков), выращенных на пептонном агаре в течение 3-4 дней. Препарат проявляется в виде мелких или сферических клеток в виде неправильных скоплений.

2. Препараты сарцины готовят из культуры сарцины желтой (желтой), выращенной на пептонном агаре в течение 3-4 дней. Они образуют пакеты из 8 или 16 клеток.

3. Для знакомства со стрептококками используют фиксированный окрашенный препарат, приготовленный из кефира или сметаны. В ней наблюдается *Streptococcus lactis*, осуществляющий гомоферментативное молочнокислое брожение.

4. Смазку готовят из обезжиренного кефира (простокваши) на стекле изделия, после фиксации окрашивают метиленовым красителем щелочным синим в течение 1-2 минут, подсушивают фильтровальной бумагой и синими цепочками сферических ячеек в иммерсионной системе.

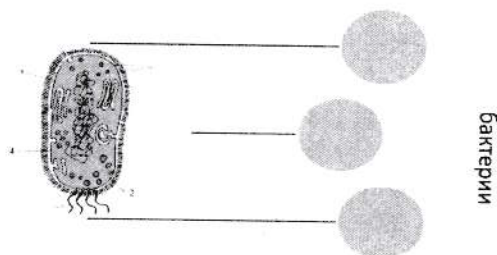
5. *Staphylococcus aureus* считается окрашенным в золотой цвет стафилококком, готовым для введения стафилококкам. При этом видны сферические клетки. (19-рисунок).



Контрольные вопросы:

1. Какие виды шаровидных бактерий вы знаете?
2. Какие бактерии входят в состав диплококков?
3. Приведите примеры представителей патогенных и положительных палочек.
4. Какие виды шаровидных бактерий существуют?
5. Охарактеризуйте шаровидные бактерии.

Технологии, используемые для закрепления знаний учащихся. Метод «Кластер»



Цель технологии: Данная технология позволяет участникам быстро соображать.

Это помогает развивать отзывчивость. Получении информации, обобщение, а также навыки самостоятельного творческого мышления. Данную технологию рекомендуется использовать на лекциях, на подкреплении, задании вопросов, выполнении домашних заданий и анализе результатов практических занятий.

1. Создайте кластер по морфологии бактерий
2. Создайте и объясните по видам шаровидных бактерий.
3. Создайте кластер по морфологии палочковидных бактерий.

Лабораторная работа №10

Тема: Изучение водной микрофлоры

Цель работы: Изучение микроорганизмов в воде и оценка чистоты воды.

Необходимое оборудование и инструменты: автоклавируемые стерилизованные пол-литровые бутылки, спирт, ватные палочки, колбы, пробирки, пипетки, стаканы различных размеров, чашки Петри, термостат, дозаторы GFA и Endo, электронная доска, световой микроскоп с цифровой камерой и т.д.

Теоретическая информация:

Систематическое бактериологическое исследование воды состоит из: 1) подсчета общего количества микроорганизмов в 1 мл воды; 2) определить интенсивность фекального загрязнения воды по коли-индексу (определение количества кишечной палочки в 1 л воды) и коли-титру (определение минимального количества воды, представляющей кишечную палочку). Для достижения этих целей необходимо взять надлежащую пробу воды. Исследуемую воду разливают в стерилизованные пол-литровые бутылки в сушильном шкафу или автоклаве.

Водопроводную воду в кране удаляют после слива воды в течение 10 минут, закрыв спиртовой тампон ватным тампоном, пропитанным спиртом, и простерилизовав его приблизительно. К 500 мл хлорированной воды добавляют 2 мл 1,5% гипосульфата натрия для связывания хлора. Пробы воды отбираются из открытых водоемов на глубине 15 см с помощью батометра. Интервал между доставкой пробы воды в лабораторию не должен превышать 2 часов. Летом его доставляют на льду, а зимой на джакузи.

Ход работы:

Определение общего количества бактерий:

1. Исследуемую воду сначала разводят в нескольких пробирках, содержащих по 9 мл стерильной воды.

2. Для этого берут 1 мл испытуемой воды и добавляют к раствору 9 мл дистиллированной воды, это первое разведение, степень разбавления которого устанавливается 1:10.

3. Отбирают еще 1 мл этого разведения и переносят чистой пипеткой во второй 9 мл раствор дистиллированной воды, причем степень разведения пробы в этом растворе устанавливают 1:100.

4. В таком же порядке осуществляли разбавление до 10-10 матов.

5. Обычно получают не менее 2 уровней разведения с учетом образования менее 30 и не более 300 колоний в чашках Петри.

6. Отбирают 1 мл проб разбавленной воды и помещают в стерильные чашки Петри, сверху заливают расплавленным и охлажденным до 45°C GPA и перемешивают, переворачивая чашку.

7. После заморозки чашки Петри помещают в термостат при 37°C. Через 1 сутки подсчитывают количество колоний с помощью лупы 5 раз.

8. Общее количество бактерий в воде рассчитывается исходя из того, сколько раз она была разбавлена. Например, на чашке Петри в 1 мл образца, разбавленного 1:100, было обнаружено 120 колоний, значит, общее количество колоний в 1 мл составило 12 000. Согласно требованиям ГОСТ 18963-73 водопроводная вода должна содержать менее 100 бактерий в водозаборных скважинах и открытых водоемах.

Определение коли-индекса и коли-титра Есть 2 способа:

1) фильтруют воду на мембранном нитроцеллюлозном фильтре, помещенном в стерилизованную воронку Цейца, после кипячения в течение 10 минут;

2) классический или брожение. 1-й проще, быстрее, 2-й - требует больше труда - требует выделения чистой культуры кишечной палочки, ее биохимической идентификации, но дает очень четкий результат. Для определения коли-индекса и коли-титра берут 333 мл или 500 мл воды из городской водопроводной сети.

Метод мембранных фильтров:

1. Исследуемую воду пропускают через мембранный фильтр №3, создавая небольшой вакуум. Он ловит кишечные палочки.

2. Затем мембранные фильтры стерильным пинцетом переносят в чашки Петри со средой Эндо и помещают в термостат при 37°C.

3. Через 1 сут инкубации на поверхности мембранных фильтров вырастают темно-красные, Гр (-), бесспоровые колонии с характерным для кишечной палочки металлическим блеском.

4. Фильтры ставят на оксидазные индикаторы.

5. Бесцветные красные колонии культивируют в полужидкой среде с 0,5% глюкозой.

6. Наблюдение пузырьков газа (углеводного брожения) на 1-2 сутки роста свидетельствует о наличии в воде кишечных палочек. Результаты выражаются в коли-индексе. Например, в фильтре образовались 2 колонии кишечной палочки. Поскольку фильтруется 500 мл воды, в 1 л содержится 4 бактерии. Если коли-индекс равен 4, коли-титр равен 250 (1000:4).

Метод ферментации:

1 этап: 1) посев водопроводной воды на глюкозо-пептонную среду Эйкмана (типичная среда содержит 10 г пептона, 5 г глюкозы и хлорида натрия на 1 л и в 10 раз больше концентрированной); в котором 10 и 100 мл воды вносят в концентрированную среду и меньшее количество в обычную среду;

2) Имплантаты помещают в термостат при 43°C для подавления развития кишечных палочек.

2 этап: 1) через 7-12 часов имплантаты вынимают из термостата; из всех пробирок и флаконов культивируют на искривленной среде Олькенецкого глюкозо-лактозо-сахарозной вне зависимости от наличия в них признаков роста;

2) Предыдущий и последующий посев снова ставят на термостат. При наличии в воде кишечной палочки в среде

Экмана наблюдается брожение, а в среде Олкеневского окрашивание в колонке происходит по мере образования газа.

Более точные результаты дает пересев культур со среды Эйкмана на среду Эндо. Его также можно определить по посадке в цветной ряд Гисса, но это займет несколько дней. При этом: 1) достигается выделение эшерик человека, псевдомонад с оксидазной активностью сходной с их морфологическими и биохимическими свойствами, особенно от цитробактеров и аэробактеров, или 2) пресное загрязнение воды (обнаружение кишечной палочки) определяет граница дифференциации от первых (ассоциации кишечной палочки, *Citrobacter termedius* и *Aerobacter aerogenes*). Определение коли-индекса методом ферментации проводят по ГОСТ 18963-73.

Помимо кишечной палочки, индикаторами фекальной контаминации воды (иных объектов) являются энтерококки, белки, клостридии, энтеровирусы и представители кишечной микрофлоры, длительно персистирующие вне организма человека. По эпидемиологическим показателям из воды выделяют фаги, вызывающие кишечные инфекции, а также соответствующие им фаги.

Контрольные вопросы:

1. Как изучать водную микрофлору?
2. Что такое коли-титр и объяснить, как его изучать?
3. Коли-индекс и как его изучать?
4. Какие микроорганизмы служат индикаторами при определении чистоты воды?
5. Опишите этапы применения метода мембранной фильтрации.
6. Охарактеризуйте этапы применения метода ферментации.
7. Как определяется общее количество бактерий?
8. Каковы показатели обнаружения загрязнения воды?

Лабораторная работа №11

Тема: Изучение микрофлоры воздуха

Цель работы: Обнаружение микроорганизмов в воздухе различных помещений.

Необходимое оборудование: Чашки Петри, среда ГПА, термостат, бактериальная петля, баня, лестница, посуда, стеклянная лампа, микроскоп, толуол, генцианвиолет, пропитанный фильтровальной бумагой, электронная доска, световой микроскоп с цифровой камерой и т.д.

Теоретическая информация

Бактериологическое исследование или обследование на воздушно-капельные микроорганизмы проводят для контроля санитарно-гигиенического состояния и качества дезинфекции медицинских учреждений.

При испытаниях воздуха 1 м³ – это общее количество микроорганизмов в воздухе, особенно патогенных бактерий и вирусов. Следует отметить, что резко ограниченной нормы количества микробов в воздухе зданий не существует. Пробы воздуха отбираются седиментационным или аспирационным методами.

Седиментационный метод. Чашки Петри с ГПД или другими специальными средами размещают на разной высоте от пола досматриваемого здания под открытым небом. В среднем рекомендуется брать 1 пробу с каждых 20 м² здания. Продолжительность воздействия зависит от наличия примерного количества микробов в воздухе. Соответственно чашки Петри оставляют открытыми на 5-10 или 20-40 минут, затем закрывают крышкой и инкубируют 24 часа при +37 °С. Его выращивают при комнатной температуре еще 48 часов в защищенном от света месте. Затем изучают характер микрофлоры и подсчитывают количество колоний в 1 м² воздуха по специальной таблице. Количество колоний, выращенных на чашках Петри, умножают на один из

множителей. Если на чашке площадью 78,5 см² за 10-минутную экспозицию выросло 40 колоний, тогда количество микробов в 1 м³ воздуха равно 2400 (40х60). Более того, в экспозициях вносятся определенные изменения, т. е. мультипликативная экспозиция уменьшается в соответствии с частотой увеличения.

Метод аспирации. Для исследования воздуха таким способом применяют улавливатели бактерий различной конструкции, часто с использованием аспирационного аппарата Кротова. У него открыта крышка, в ней чашка Петри с питательной средой, крышка прибора закрыта, затем запускается двигатель. Воздух поступает в чашку Петри через кинжальное отверстие и с силой ударяется о поверхность питательной среды. Вращение устройства обеспечивает равномерное распределение микроорганизмов по чашке Петри. Обычно пропускается 50-100 л воздуха со скоростью 25 л в минуту. Через 2-4 минуты чашку Петри снимают с прибора, закрывают крышкой и помещают в термостат.

Например, после инкубации на чашке Петри вырастает 250 колоний, а воздух пропускают в течение 2 минут со скоростью 25 л в минуту, т. е. 50 л воздуха. Количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха 5000 (250:1000).50.

Характер микрофлоры воздуха изучают просто: описывают колонии, готовят из них жиры, выделяют чистые культуры, проводят их идентификацию.

Воздух – это природная среда, богатая различными микроорганизмами. Для выявления в них микроорганизмов применяют различные, простые и сложные методы. Простые методы включают метод «тонущего» Коха. По этому методу чашку Петри с твердой питательной средой открывают на 5 минут в определенном помещении - в классе, прихожей, кухне, на улице, под деревьями и в других местах. За это время клетки микроорганизма попадают на питательную среду.

Затем крышку чашки Петри закрывают, а на крышке пишут, кто, когда и где проводил эксперимент. Затем чашку Петри помещают в термостат при +28-30°C и оставляют для роста на 7 дней.

При благоприятных условиях клетки, попадающие в питательную среду, размножаются и образуют видимые скопления - колонии. Каждая колония считается образованной из одной клетки.

Таблица 3
Бактериологические показатели чистоты воздуха
(По Чистовичу Г.Н, 1968 г.)

Номера	Количество микробов
Состояние операционной:	
Перед работой	Более 500
После окончания операции	Более 1000
Роддом	Не более 1500
Комната новорожденного	-"-"
Воздух больниц	
Летом	3500 и меньше
Зимой	5000 и меньше
Размещение воздуха:	
Летом	Более 1500
Зимой	Более 4500

Колонии микроорганизмов различны по форме, цвету, размеру, консистенции, оптическим свойствам. При анализе микроорганизмов воздуха в первую очередь подсчитывают общее количество колоний и на его основе определяют количество микробов в воздухе по уравнению Омелянского:

$$x = \frac{a \cdot 100 \cdot 1000 \cdot 5}{S \cdot 10 \cdot t}$$

где: x - количество микробов в 1 м³ воздуха; a - количество колоний на чашке; S - поверхность пластины, см² (78,5); t - время, в течение которого тарелка открыта, мин.; 5 - Время, установленное на счете Омелянского; Объем воздуха, находящийся на пластине за 10—5 мин, л; 100 - поверхность погружения, см²; 1000 - объем проверяемого воздуха, л.

Затем производят дифференциальный подсчет и описывают растущие микроорганизмы: грибы, бактерии, готовят под микроскопом наиболее характерные бактериальные колонии (розовые, желтые, бесцветные) путем приготовления препаратов методом «сжатой капли». Колонии этих микроорганизмов также являются хорошим материалом для окрашивания по Граму. Наблюдения показывают, что в воздухе часто встречаются различные шарообразные: пигментированные микрококки, сарцины и др.

Полученные результаты определяют путем сравнения таблицы с чистотой воздуха (таблица 3). Показатель микроорганизмов за год также приведен в таблице ниже (таблица 4).

Таблица 4

Бактериологический показатель чистоты воздуха в течение всего года

Чистота воздуха	Количество микробов в 1 м ³ воздуха			
	Общий	Гемолитический стрептококк	Общий	Гемолитический стрептококк
	Летом		Зимой	
Чистый	1500 и меньше	16 лет и меньше	4500 и меньше	36 лет и меньше
Умеренно загрязнен	1500 - 2500	16-35	4500-7000	36-125
Загрязненный	Более 2500	Более 35	Более 7000	Более 125

Ход работы:

1. Чашку Петри, приготовленную путем заливки GPD, берут и раздают 3 ученикам из группы;
2. Чашки с едой оставляют открытыми на 10 минут на кухне, в коридоре или другом помещении;
3. Чашку Петри закрывают, заворачивают в бумагу, пишут смазанной маслом ручкой и помещают в термостат;
4. В следующем упражнении его вскрывают, подсчитывают и рассчитывают микроорганизмы в нем по формуле Омелянского и определяют микроорганизмы в 1 м³ воздуха;
5. Из одной из образовавшихся на чашке Петри колоний готовят фиксированный окрашенный препарат, наблюдают под микроскопом и рисуют в рабочей тетради.

Контрольные вопросы:

1. Какие методы изучения микрофлоры воздуха вы знаете?
2. Какие виды микроорганизмов присутствуют в воздухе?
3. Какое значение имеет изучение микрофлоры воздуха?
4. Объясните величины, указанные в формуле Омелянского.
5. Как изучить микрофлору воздуха?
6. Что такое метод седиментации и его важность?
7. Как пользоваться аспирационным аппаратом Кротова?
8. Охарактеризуйте питательные среды, используемые при определении микрофлоры воздуха.

Лабораторная работа №12

Тема: Идентификация микроорганизмов окрашиванием по Граму

Цель работы: Изучить идентификацию различных микроорганизмов методом окрашивания по Граму.

Необходимое оборудование: Чашки Петри, среда ГПА, термостат, бактериальная петля, ванна, лестница, посуда и покровное стекло, спиртовка, микроскоп, толуол, генцианвиолет, пропитанный фильтровальной бумагой, краситель щелочной фуксин, спирт этиловый 96%, люголь, электронная доска, световой микроскоп с цифровой камерой и т. д.

Теоретическая информация:

В практике микробиологии широко используется метод дифференциальной окраски бактериальных клеток по Граму.

Таким образом краситель был введен в 1884 датским ученым Г. Грамом и с тех пор используется в качестве диагностического маркера. Бактерии различают **грамположительные (грам+)** и **грамотрицательные (грам-)**. Грамположительные бактерии окрашивают генцианвиолетовым красителем, обрабатывают некоторыми веществами (протравливают), а затем обрабатывают 96° этанолом, пурпурная окраска сохраняется. У грамотрицательных бактерий, даже окрашенных генцианом, он обесцвечивается при воздействии этанола. Их можно красить любым дополнительным красителем, например фуксином. Так, после выполнения этапов окрашивания по Граму грамположительные бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет, а грамотрицательные - в красный.

Об этом свидетельствуют исследования ряда авторов. Показывает, что Грам(+) и Грам(-) бактерии различаются не только по окраске, но и по своей чувствительности к действию некоторых антибиотиков (пенициллинов), сульфамидных

препаратов, лизоцима, протеолитических ферментов и др. Также было обнаружено, что бактерии Грам (-) нерастворимы в 1% NaOH. Грамотрицательные бактерии, напротив, полностью растворяются.

В настоящее время эти свойства окрашенных по Граму бактерий авторы связывают с молекулярным строением и химическим строением клеточной стенки.

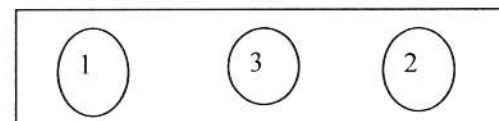


Схема окрашивания по Граму:

1. *Saccharomyces cerevisiae* (Дрожжи) - (Грамположительные);
2. *Pseudomonas melochlora* - (Грамотрицательные);
3. Исследовательская культура - (Gram X)

Обычно окрашиваемые по Граму клетки представляют собой молодые, чаще однодневные культуры, поскольку удержание красителя в некоторой степени зависит от физиологического состояния бактерии.

Ход работы:

Окраска методом Грама осуществляется следующим образом:

1. В окне обезжиренного продукта приготовлены 3 смазки - тестируемая культура в центре, а контрольные культуры слева и справа. В этом случае одна культура должна быть Грам (+), а другая Грам (-);
2. В качестве исследуемой культуры можно использовать воздушные микроорганизмы, выращенные на чашках Петри;
3. Смазки следует готовить очень тонко, чтобы они равномерно распределялись по поверхности, стекла;
4. Препарат высушивают на воздухе, фиксируют в пламени и охлаждают.

5. Затем его окрашивают генцианом в течение двух минут. Для этого жир покрывают бумагой, пропитанной красителем генциал фиолетовым;

6. По истечении времени окрашивания цветную бумагу снимают и обрабатывают раствором Люголя, представляющим собой раствор йода в йодисто-калиевой воде, в течение двух минут, не промывая водой;

7. Раствор Люголя сливают, жир промывают водой и просушивают фильтровальной бумагой;

8. Затем предпринимаются ответственные действия: препарат кратковременно обесцвечивается этанолом при 96 градусах в течение от 30 секунд до 1 минуты;

9. Быстро промывают водой и повторно окрашивают фуксином в течение 2 мин, после ополаскивания водой подсушивают фильтровальной бумагой, исследуют под микроскопом в иммерсионной системе и записывают в рабочую тетрадь.

При правильной окраске препарата грамположительные микроорганизмы (грамм+) окрашиваются в фиолетовый цвет, грамотрицательные (грамм-) — в красный.

Контрольные вопросы:

1. Кто ввел метод Грама и почему?
2. Какая особенность этого метода основана на микроорганизмах?
3. Какие микроорганизмы используются при окрашивании по Грамму?
4. Почему наблюдается обесцвечивание у G+ микроорганизмов?
5. Объясните этапы метода окраски по Граму.

Лабораторная работа №13

Тема: Изучение почвенных микроорганизмов

Цель работы: Изучение почвенных микроорганизмов микроскопическим методом.

Необходимые инструменты и оборудование: образцы почвы, шпатель, раствор, трубка, пробирки, чашка Петри, стерильная вода, термостат, микроскоп, кедровое масло, изделия из стекла, покровное стекло, бактериальная петля, фуксин, фильтровальная бумага, спиртовка, толуол, генцианвиолет, пропитанный маслом из фильтровальной бумаги, электронная доска, световой микроскоп с цифровой камерой и т. д.

Теоретическая информация

Согласно пункту 3.3 Стратегии действий Республики Узбекистан на 2017-2021 годы, задачи, направленные на «Модернизацию и ускоренное развитие сельского хозяйства», обеспечение населения Республики качественными продуктами питания, обеспечение продовольственной безопасности являются одними из основных задач. Это, безусловно, неразрывно связано с такими важными вопросами, как определение состояния почвы, повышение ее плодородия. Это в свою очередь требует изучения микроорганизмов, обеспечивающих важные микробиологические процессы в почве.

В большинстве случаев исследование и количественный анализ почвенных микроорганизмов проводят в чашке Петри. Одним из методов для этого является обнаружение ряда почвенных микроорганизмов: бактерий, актиномицетов, грибов и дрожжей. Посадку под или в слой питательной среды применяют редко. Ряд проблем предполагает идентификацию между грибами в питательной среде. При этом 1 мл почвенной суспензии наливают в чашку, превращают в незастывший агар и ставят на ровную поверхность для равномерного

застывания. Этот метод предотвращает рассыпание и растекание мицелл по поверхности чашки при нанесении почвенной суспензии на поверхность питательной среды с помощью шпателя. В некоторых случаях этот метод также используется для обнаружения бактерий. Этот метод предотвращает рассыпание и растекание мицелл по поверхности чашки при нанесении почвенной суспензии на поверхность питательной среды с помощью шпателя. В некоторых случаях этот метод также используется для обнаружения бактерий. Этот метод предотвращает рассыпание и растекание мицелл по поверхности чашки при нанесении почвенной суспензии на поверхность питательной среды с помощью шпателя. В некоторых случаях этот метод также используется для обнаружения бактерий.

В стерилизованную чашку Петри в каждую чашку наливают по 20-30мл раствора агара, растворенного на водяной бане. Питательные среды обычно разливают из большой пробирки в несколько чашек. Учтите, что чашки должны быть одинаковой формы и одинакового диаметра, с ровным дном. При наливании питательной среды в чашки необходимо следить за тем, чтобы все они были заполнены в равном количестве. В некоторых случаях в пробирки вносят точно отмеренные питательные среды, стерилизуют в пробирках и помещают в чашку Петри таким способом, чтобы количество питательной среды в чашке было стандартизировано. Чашки с питательной средой следует ставить на ровную твердую горизонтальную поверхность, так как питательная среда в ней должна затвердевать до одинаковой толщины.

Если среда не должна затвердевать при наливании в чашку, целесообразно наливать ее при температуре 50°C, в этом случае на крышке чашки будет конденсироваться меньше воды. После застывания чашки переливают в сушильный шкаф

и нагревают до 70-80°C, сушат до исчезновения воды с крышки и до образования гладкой пленки на поверхности агара. Это свидетельствует об исчезновении водной пленки на поверхности агара. Причина подсушивания чашки в том, что козявкам микроорганизмов, выросших из высаженного образца, нужно будет плавать на поверхности, если они не мешают. При сортировке и количественном определении грибов чашку не всегда высушивают.

Посадку следует производить после того, как стаканчик подсохнет. Чашку, наполненную питательной средой, нельзя хранить без посева длительное время, так как микроорганизмы могут попадать из воздуха и образовывать невидимые невооруженным глазом микроколонии. При посадке через шпатель они могут образовывать колонии, не принадлежащие почвенной микрофлоре, на поверхности всей питательной среды.

Подготовленную к посадке почвенную суспензию встряхивают в течение 5 минут, а затем охлаждают в течение 30 секунд, чтобы дать осесть крупным частицам почвы. Затем с помощью стерилизованной пипетки отбирают 1 мл и переносят в пробирку, содержащую 9 мл стерилизованной воды. Суспензию хорошо перемешайте новой пипеткой, возьмите 1 мл, добавьте в раствор и перемешайте, как указано выше. Последующие разведения выполняются таким же образом. Посев осуществляют в стаканчики из необходимых разведений. Для этого на поверхность агаризованной среды втирают 1 каплю суспензии. Посадочный стакан помещают в термостат в перевернутом положении.

Обычно количество бактерий подсчитывают через 3 дня, актиномицетов - через 7-15, грибов и дрожжей - через 20 дней через 5-7 дней. Если микроорганизмы высеяны в бедные питательными веществами среды, в том числе агаризованной воду, почвенную вытяжку и т.п., то расчет производят через 7-

14 дней. Необходимо провести вычислительную работу той же продолжительности для получения сравнительной информации о количественных показателях той или иной группы микроорганизмов. Следует отметить, что при длительной инкубации вырастает колония многих микроорганизмов.

Количество колоний в чашке обычно подсчитывают, помещая чашку вверх дном на черный фон. Точечные колонии заменяют точкой с помощью ручки или масляной ручки, чтобы их не учитывали дважды. Дно чашки разделено на кусочки карандашом для удобства счета. В непрозрачных средах подсчет ведется на поверхности чашки.

Метод частиц почвы. Если группа изучаемых микроорганизмов в почве невелика, то при необходимости их можно разделить, поместив частицы почвы на поверхность агаризованной среды без получения обогащенной культуры. Обычно берут 5-10 г почвы, смешивают с водой до состояния пасты и располагают параллельно поверхности агара. Конечно, необходимо проводить посадку в несколько параллельных стаканчиков. Нанесение трафарета на заднюю часть чашки, чтобы кусочки почвы были плоскими и легкими, облегчит работу. Разумеется, посадку следует производить в несколько параллельных стаканчиков.

После роста микроорганизмов подсчитывается процент фрагментов почвы, в которых выросла определенная группа микроорганизмов, что может быть получено при необходимости углубленного изучения микроорганизмов или для получения чистой культуры микроорганизмов вокруг фрагментов почвы. Этот метод применяют для выделения из почвы азота, нитрификаторов, целлюлозоразлагающих микроорганизмов, грибов, дрожжей, относящихся к роду *Lipomyces*, для определения их численности, а также для выявления бактерий из бедных почв, например песка.

При обнаружении азотобактерий почвенные частицы высаживают на поверхность Эшби или другой питательной среды, в которой хорошо растут микроорганизмы. Для этого 100 мг почвы разводят до пастообразного состояния и с помощью бактериологической петли помещают на поверхность двух чашек Петри, причем в каждой чашке желательно иметь по 50 штук. Количество липомицетов из почвы также определяют путем посева на пропитанную сахарозой среду Эшби. После посева стаканчики помещают во влажную камеру при 26-28 °C. Подсчет азотобактеров проводят через 6-10 дней, липомицетов через 15-20 дней.

Для посадки каждого образца почвы требуется следующая подготовка:

1. Круглодонная пробирка или пробирка Эрленмейера объемом 250 мл со 100 мл стерилизованной водопроводной воды;
2. Если необходимо приготовить суспензию путем измельчения почвы, стерильную пробирку, как указано выше, без воды;
3. Ступка для измельчения почвы;
4. Пробирки, содержащие 9 мл стерилизованной водопроводной воды. Количество пробирок получают в зависимости от уровня разбавления, в котором осуществляется посев. Обычно берут 2 или 3 пробирки.
5. Пипетки, стерилизованные на 1 мл, также подбирается в зависимости от степени разведения. Для каждого уровня разбавления требуется новая пипетка. Однако для помещения образца в чашку Петри также требуется новая пипетка. Следует определить, сколько капель содержится в пипетке объемом 1 мл, и поэтому должны быть получены пипетки с такой же каплей.
6. В стерилизованных шпателях используют один шпатель для параллельных чашек, засеваемых при одном

уровне разведения и помещаемых в одну и ту же питательную среду для каждого уровня разведения и для каждой питательной среды.

7. Стерилизованная чашка Петри. Развести планку, приготовленную из каждой пробы, и 3-5 чашек для отдельных питательных сред. В некоторых случаях посев проводят в 2 параллельных стаканчика, при этом расчеты и результаты не ясны.

8. Стерильные среды и пробирки.

Ход работы:

1. Образец почвы удаляют с поверхности почвы на 2 см с помощью стерилизованного шпателя или спиртового тампона и извлекают из стерильного конверта или банки;

2. После взвешивания 1 г образца почвы его очищают от лишних растительных остатков;

3. Очищенную пробу почвы помещают в фарфоровую банку и заливают 1-2 мл стерилизованной воды, хорошо измельчают почву пальцем в резиновых перчатках и помещают эту пробу в колбу Эрленмейера со 100 мл стерилизованной воды;

4. После встряхивания пробирки с почвой в течение 5 мин крупные частицы почвы оставляют осесть на 30 с, а 1 мл разбавленной суспензии почвы отбирают стерильной пипеткой и помещают в раствор, содержащий 9 мл стерилизованной водопроводной воды. Из этого раствора берут еще 1 мл суспензии, добавляют к следующему раствору и разводят таким же образом;

5. Затем берут по 0,1 мл каждого из растворов в разведении 10-3, 10-4, среду выливают в затвердевшую чашку Петри и засевают в среду шпателем Драгильского;

6. Чашки с имплантированным микроорганизмом помещают в термостат и наблюдают за ростом клетки микроорганизма;

7. В следующем упражнении берут чашки и выделяют выросший в ней микроорганизм из колоний путем фиксации окрашенного препарата и наблюдают под микроскопом на иммерсионном объективе;

8. Зарисуйте в рабочей тетради форму изучаемого под микроскопом микроорганизма и с помощью учителя и определителя определите, что это за микроорганизм.

Обнаружение микроорганизмов методом почвенных частиц проводят следующим образом:

1. Взять 5-10 г земли, положить в фарфоровую ступку и растолочь до состояния пасты;

2. Под чашку Петри подкладывают трафарет, на поверхность питательной среды укладывают до 50 кусочков грунта и выдерживают в термостате при 26-28°C в течение недели;

3. Для выделения азотобактера используют питательную среду Эшби, налитую в чашку Петри.

4. После некоторого инкубирования вокруг почвенных частиц можно наблюдать культуру бесцветного слизистого микроорганизма;

5. С помощью этой бактериологической петли из этой культуры готовят фиксированный окрашенный препарат, наблюдают под микроскопом и заносят в рабочую тетрадь картину наблюдаемого микроорганизма.



Контрольные вопросы:

1. Какие существуют методы изучения почвенных микроорганизмов?

2. Как взять образец почвы и подготовить его к посадке?

3. Какие микроорганизмы используются при изучении почвенных частиц?

4. Объясните, насколько важно разбавлять почву.

5. Какая часть почвы богата микроорганизмами?
6. Как отделить азотфиксирующие микроорганизмы от почвы?
7. В каких частях почвы распространены микроорганизмы и объясните их причину?
8. Как получить чистую культуру почвенных микроорганизмов?

Лабораторная работа №14

Тема: Подготовка питательной среды для роста микроорганизмов.

Цель работы: Приготовление элективной питательной среды для микроорганизмов, осуществляющих различные процессы.

Оборудование: пробирки разных размеров, пробирки, чашки Петри, химические стаканы, специфические реактивы для каждой питательной среды, дистиллированная вода, электронные весы, автоклав, термостат, электронная доска, световой микроскоп с цифровой камерой и др.

Теоретическая информация

В микробиологии питательной средой называют среду, в которой бактерии или другие микроорганизмы содержат различные соединения простого и сложного состава, используемые для размножения в лаборатории или на производстве.

Любая питательная среда должна отвечать следующим требованиям: сохранять все легкоусвояемые вещества, необходимые для размножения тех или иных микроорганизмов, иметь оптимальную влажность, вязкость, pH, быть изотонической и максимально прозрачной. Каждая питательная среда должна быть стерилизована определенным методом в зависимости от ее состава.

Ряд питательных сред готовят в самих лабораториях из продуктов животного и растительного происхождения (говядина, молоко, сыворотка, овощи, дрожжи, казеин и др.). Либо изготавливается из искусственно полученных веществ (пептона, аминокептида, дрожжевого и кукурузного экстракта) из этих продуктов.

Факторы роста, катализирующие метаболитические процессы в питательных средах, в частности витамины группы В, никотиновая кислота и др. наличие важно.

По назначению питательные среды делятся на основные, элективные и дифференциально-диагностические.

Большинство основ подходят для выращивания бактерий. Эти рыбные продукты представляют собой гидролизаты или казеин, из которых при питательной ценности готовят жидкие среды - питательные супы и твердые вещества.

Такие среды имеют более сложный состав, например, служат основой для приготовления сахаристых, кровянистых, сывороточных и других комбинированных питательных сред, удовлетворяющих пищевые потребности более требовательных болезнетворных бактерий. Иногда в качестве основы используют синтетические питательные среды, содержащие некоторые минеральные соли, к которым добавляют аминокислоты, витамины и глюкозу. Они также могут быть дополнены пептоном, кукурузным или дрожжевым экстрактом и другими питательными веществами. Синтетические среды часто используются в исследовательской практике, а упомянутые выше синтетические среды используются в микробиологии для получения антибиотиков, вакцин и других лекарственных средств.

Элективные среды предназначены для селективного выделения и воспроизведения определенного вида микробов из различных материалов, содержащих микрофлору. Создание элективных сред для той или иной группы микроорганизмов

обусловлено биологической специфичностью этого микроба, отличающей его от многих других. Например, хороший рост стафилококковых бактерий наблюдается при высоких концентрациях хлорида натрия, тогда как холерные вибрионы хорошо растут в щелочной среде, а з.

Дифференциально-диагностические питательные среды применяют для дифференциации разных видов (или групп) микроорганизмов. Принцип создания дифференциально-диагностических питательных сред отличается друг от друга биохимической активностью разных видов бактерий и имеет разные наборы ферментов, расщепляющих субстраты в питательной среде. Дифференциально-диагностические питательные среды включают следующие основные компоненты: а) основную питательную среду для роста бактерий; б) специфический химический субстрат (например, лактоза) является диагностическим маркером микроба, к которому он относился по-разному; в) цветовой индикатор (например, индикатор Андрее), изменение его окраски свидетельствует о биохимической реакции и свидетельствует о наличии данной ферментативной системы в изучаемом микроорганизме. Дифференциально - диагностические питательные среды применяют для дифференциации и идентификации бактерий в микробиологических диагностических исследованиях в лабораториях.

Для получения обогащенной культуры микроорганизмов почву или субстрат высевают на следующие питательные среды:

1) пептонный бульон - для микроорганизмов (аммонификаторов), расщепляющих органический азот (белок) до аммиака. Экологический состав: 1 л водопроводной воды, пептон - 10г, NaCl - 5г Na_2HCO_3 - 0,1г.

2) Среда Виноградского - для нитрификаторов окисляют аммиак до оксида азота и далее до азотной кислоты:

$\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$. Они автотрофы, поэтому в питательную среду не вносят органический источник углерода. Его готовят из минеральных солей: (в 1 л дистиллированной воды, гр: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 2; K_2HPO_4 - 1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; NaCl - 2; FeSO_4 - 0,4; CaCO_3 - 10).

3) Среда Гилтая - для денитрификаторов возвращают азотную кислоту в молекулярный азот: $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$. Состав среды следующий: 1 л. в воде дистиллированной, г: цитрат натрия - 2,5; KNO_3 - 2; пептон - 1; KH_2PO_4 - 2; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 2; $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; FeCl_3 - след. В среду добавляют 1-2 мл 1% спирта до тех пор, пока синий бромтимоловый индикатор не станет зеленым.

4) Среда Эшби - для свободноживущих азотфиксаторов - поглощает из атмосферы свободный молекулярный азот (в 1 л дистиллированной воды, г: маннита - 20; K_2HPO_4 - 0,2; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; NaCl - 0,2; K_2SO_4 - 0,1; CaCO_3 - 5,0.). Эту среду еще называют «безазотной», потому что она не содержит азота.

5) Среда Рашмана предназначена для жирнокислотных бактерий, расщепляющих сахар до жирных кислот: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$.

Картофель нарезают квадратиками и кладут в пробирки, добавляют 0,05 г мела и заливают водопроводной водой.

6) Для аэробного расщепления клетчатки готовят среду Гетчинсона и Клейтона: 1 л в дистиллированной воде, г: K_2HPO_4 - 1; $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3; NaCl - 0,1; $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,01; NaNO_3 - 2,5. Сухие растворы предварительно заполняют кусочком фильтровальной бумаги (1x7 см), являющейся источником углерода (волокна) для полученных групп микроорганизмов, и в растворы вливают минеральный раствор до половины фильтровальной бумаги.

Ход работы:

1. В различные элективные питательные растворы с помощью шпателя вносят 0,5 - 0,7 г почвы;

2. Образцы образцов почвы помещают в емкость и маркируют датой посева и фамилией сеялки;

3. Инкубационный термостат $t = \text{При } +25-28^{\circ}\text{C}$ в течение 7-21 дней;

4. Обогащенная культура анализируется на последующих уроках;

5. Анализ роста на жидких питательных средах;

6. Рост микроорганизмов на таких питательных средах одинаков.

7. Характеризуется помутнением среды, образованием завес или отложений.

8. Характеризуя рост микроорганизмов в жидкой среде, определяют степень помутнения - слабая, умеренная или сильная, специфику оболочки - тонкая, плотная или разреженная, гладкая или искривленная, образование осадка - низкое, высокое, слизистое, описывается как фрагментарный.

9. Часто рост микроорганизмов сопровождается появлением специфического запаха, пигментацией окружающей среды и газовой выделением.

10. Выявляют газовыделение по образованию пены, пузырьков, а также «поплавок» — небольших трубочек с закрытым одним концом.

11. Перед стерилизацией среды поплавок кладут закрытым концом вверх и должны быть полностью заполнены водой. Когда газ выпускается, он собирается в виде пузырька в поплавке.

Для анализа характера роста микроорганизмов в жидких средах их выращивают на GPA или других средах, обеспечивающих их хороший рост.



Контрольные вопросы:

1. Что такое питательная среда?

2. Какие виды питательных сред вы знаете?

3. Что понимается под выборными и универсальными средами?

4. Питательная среда Эшби и какие микроорганизмы используются для её выделения?

5. Что такое питательная среда Рашмана и её состав?

6. Для выделения каких микроорганизмов используется среда Геченсина и Клейтона?

7. Что такое обогащённая культура?

8. В какой жидкой среде выращивают микроорганизмов для анализа характера роста?

Лабораторная работа №15

Тема: Приготовление твердой питательной среды для роста микроорганизмов

Цель работы: приготовление электрически твердой питательной среды для роста микроорганизмов

Оборудование: мясо-пептонный суп, кисель, яичный белок, агар-агар, колбы разного объема, пробирки, чашки Петри, воронка, электронные весы, термостат, автоклав, электронная доска, световой микроскоп с цифровой камерой и др.

Теоретическая информация:

В зависимости от консистенции среды могут быть густыми, жидкими или полужидкими. Плотные питательные среды готовят добавлением в жидкую среду 1,5-2% агара и в полужидкую среду 0,3-0,7% агара. Если это продукт, полученный путем переработки особого вида водорослей, он вызывает затвердевание окружающей среды, он плавится при $+80-86^{\circ}\text{C}$ и затвердевает при $+40^{\circ}\text{C}$. В некоторых случаях для

придания твердости питательной среде используют также желатин (10-15%). Природные среды, такие как сыворотка крови Ivigan и яичный белок, по своей природе являются суровыми.

Реже его применяют при обнаружении видов бактерий и их отделении друг от друга, поскольку жидкая питательная среда менее благоприятна. Вместо нее используют твердую питательную среду с добавлением желатина или агара. В твердой питательной среде каждая бактерия образует свою колонию. Эти колонии различаются по цвету и форме.

Желатин или агар используют для приготовления плотной питательной среды. Кроме того, приготовленный гель можно обогатить питательными веществами и использовать для борьбы с бактериями.

Ход работы:

Приготовление мясопептонного желатина (GPJ) осуществляется следующим образом:

1. Для приготовления GPJ на 1 л пептонного мясного бульона добавляют 100-120 г растолченного желатина.

2. Чтобы растопить добавленный в суп желатин, пробирку нагревают в котле Кокса или в автоклаве. Кран должен быть открыт, чтобы температура автоклава не превышала 100°C, так как желатин теряет свои свойства при высоких температурах.

3. Смесь GPJ фильтруется после извлечения из коксового котла или автоклава. Для этого стеклянную воронку с гофрированным фильтром помещают в специальную двухслойную воронку из туники и нагревают воду внутри воронки. Это предотвращает затвердевание мясного пептона и желатина, проходящего через фильтр.

4. Фильтрат распределяют по пробиркам или пробиркам.

5. Горлышки пробирок и колб закрывают ватной пробкой и помещают в котел Кокса или автоклав.

6. Стерилизовать при 100°C в течение 15-20 минут для уничтожения микроорганизмов в растворе GPJ.

GPJ в основном используется в холодных условиях, потому что желатин плавится при нагревании до температуры 24°C. Поэтому в практике микробиологии часто используют среду, приготовленную из агара.

Приготовление мясо-пептонно-агаровой среды (МРА) осуществляют следующим образом:

1. Для приготовления GPA 15-20 г молотого агара смешивают в колбе с 1 л пептонного бульона.

2. Для растворения агар-агара в смеси пробирку помещают в автоклав и нагревают при 120°C в течение 20 минут.

3. Когда агар расплавится, белок одного яйца разводят водой и добавляют в раствор в автоклаве.

4. Крышку автоклава плотно закрывают и раствор внутри пробирки нагревают до 120°C еще 15-20 минут.

5. Белок и другие вещества в растворе под действием яичного белка выпадают в осадок, а прозрачный раствор оседает на осадок.

6. Осажденный таким образом GPA удаляют из автоклава, фильтруют через горячую воронку и распределяют по пробиркам или колбам.

7. Горловины контейнеров с GPD закрывают хлопчатобумажной пробкой, повторно автоклавируют и стерилизуют при 120°C еще 20-30 мин.

Контрольные вопросы:

1. Какие виды питательных сред делятся по концентрации?

2. Объясните, как готовят твердую питательную среду?

3. На какой питательной среде определяют виды бактерий и отделяют их друг от друга?
4. Как сделать мясной пептонный желатин?
5. Как приготовить мясопептонную агаровую среду?
6. Какой учёный первым применил твёрдые питательные среды в практике?
7. Что образуют микроорганизмы на поверхности твёрдой питательной среды?
8. Объясните почему ГПД повторно стерилизуют после разлива в пробирки?

Лабораторная работа №16

Тема: Изучение процесса спиртового брожения и участвующих в нем микроорганизмов

Цель работы: Изучить процесс спиртового брожения и участвующих в нем микроорганизмов.

Оборудование: пробирки, резиновая пробка с изогнутой стеклянной трубкой, бактериальная петля, ванна, лестница, посуда и закрывающие окна, спиртовка, водопроводная вода в пробирке, стеклянные палочки, фильтровальная бумага, пропитанная красителем генцианвиолет, дрожжи, пивные дрожжи, 10% раствор сахара, 10% раствор щелочи, раствор йода, водяная баня, раствор, термометр, микроскоп, иммерсионное масло, толуол, электронная доска, световой микроскоп с цифровой камерой и т. д.

Теоретическая информация

Ферментация – это процесс окисления и восстановления, приводящий к образованию АТФ. При брожении роль донора и акцептора водорода (или соответствующих электронов) играют органические соединения, обычно образующиеся при брожении. Следовательно, ферментация представляет собой внутренний окислительно-восстановительный процесс. При брожении происходит расщепление субстрата до конечного

продукта, сумма образующихся при их брожении веществ равна степени окисления сбраживаемых веществ. Полученные продукты не должны быть слишком окисленными и слишком необратимыми. Часто при брожении микроорганизмы используют углеводы и другие вещества (органические кислоты, аминокислоты, пурины, пиримидины). Образование АТФ при брожении происходит путем фосфорилирования субстрата. Процесс брожения протекает в облигатных анаэробных или чисто анаэробных условиях. Пастер утверждает, что ферментация — это жизнь без кислорода. Согласно современному миру, живые организмы образовались до образования кислорода в атмосфере Земли, поэтому они считали брожение простейшим биологическим окислением и получали необходимую энергию из питательных веществ в анаэробных условиях.

На сегодняшний день существует множество видов брожения, и этот процесс называется органическим веществом, которое образуется как промежуточный продукт, в том числе спиртовое брожение, молочнокислое брожение. Каждый вид ферментации осуществляется определенной группой микроорганизмов с образованием конкретных продуктов. Многие виды пчеловодства имеют большое значение в народном хозяйстве.

Ход работы:

1. Для процедуры пересадки к 3-5 г сухих дрожжей прибавляют сначала 3-5 мл 10%-ного раствора сахара, растолочь (растопить) в ступке и дать постоять 40-60 мин.
2. Налейте 50 мл в колбу на 100 мл и заранее приготовленные смесь из дрожжей.
3. Горлышко колбы представляет собой изогнутую стеклянную трубку, плотно закрывается встроеной

резиновой пробкой. Чтобы процесс брожения проходил благоприятно колбу помещают в горячую ванну при 30-35°C

4. Другой конец трубки наденьте на заполненную водой пробирку и погрузите в ванну с водой.

5. Через 20-30 минут выделяющийся в процессе брожения углекислый газ (CO_2) накапливается в пробирке.

6. Затем горлышко пробирки закрывают пальцем, пробирку поворачивают лицом вниз убирают палец и сразу же погружают в химический стакан, содержащий 10% щелочи.

7. Газ CO_2 в растворе реагирует со щелочью и щелочь замещает газ в пробирке.

8. При этом выделяющийся из пробирки газ собирают во вторую пробирку и определяют, что он не способствует горению.

Чтобы рассмотреть дрожевые грибы под микроскопом можно воспользоваться пивными дрожжами. Если пивных дрожжей нет в воде разводят хлебные дрожжи. Приготовленные в этой последовательности смесь капают одну каплю на предметное стекло и закрывают сверху покровным стеклом.

В препарате обнаруживаются грибы которые размножаются почкованием (*Saccharomyces cerevisiae*). Они овальной формы. Другие формы грибов также могут быть обнаружены в этом препарате.

Грибы содержат животный крахмал – гликоген. Для его определения препарат закапывают в раствор йода. Гликогеновое покраснение под действием йода, доказывает что полисахарид имеется.



Контрольные вопросы:

1. Что такое брожение и какие бывают ее виды?
2. Какие микроорганизмы осуществляют спиртовое брожение?

3. Какие предметы используются для обнаружения дрожжевого грибка?

4. Что образуется в результате процесса брожения?

5. В каких процессах, процесс ферментации использовался в промышленных масштабах?

6. Какой процесс брожения применяют в народном хозяйстве?

7. Объясните, какие бывают виды брожения?

8. Какие объекты используют для обнаружения дрожжевого грибка?

Лабораторная работа 17

Тема: Изучение микроорганизмов, стимулирующие процесс молочнокислого брожения

Цель работы: Наблюдение за микрофлорой в различных молочных продуктах

Оборудование: образцы различных молочных продуктов, бактериальная петля, ваночка, лестница, посуда и покровное стекло, спиртовка, водопроводная вода в колбе, стеклянные палочки, фильтровальная бумага пропитанная генцианвиолетом, микроскоп, иммерсионное масло, толуол, электронная доска, световой микроскоп с цифровой камерой и т. д.

Теоретическая информация

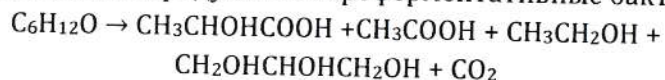
Углеродные органические вещества подвергаются микробиологическим изменениям и образуются различные промежуточные вещества или простые вещества CO_2 и вода. Зависимости какими путями происходит разложение органических веществ различаются аэробное и анаэробное дыхание.

В процессе брожения неполное окислению подвергаются вещества: этанол, молочная кислота, жирные кислоты и др. Молочнокислое брожение осуществляется молочнокислыми

бактериями, которые расщепляют моно- и дисахариды с образованием молочной кислоты. Молочнокислые бактерии делятся на 2 группы: гомоферментативные бактерии, которые от гексоз образуют от гексозы молочную кислоту по этому уравнению:



и вместе с молочной кислотой которые также производят дополнительные продукты гетероферментативные бактерии:



Бактерии, образующие молочную кислоту, принадлежащие по внешнему виду к роду палочковидных *Lactobacillus* и роду шаровидных *Streptococcus*, шаровидные одиночные, попарно или могут образовать цепочки. Это неактивные грамположительные спорообразующие бактерии.

Молочнокислые бактерии являются анаэробами или микро аэрофитами, даже в присутствии кислорода или без кислородной среды, также может повышаться: активность каталазы лет'д, хемоорганотрофы.

Почти все они о'требует факторов набухания, а также комплексных питательных веществ в рационе. Они распространены в природе. Они всегда о'встречается на проводах, в кишечнике человека и животных, в молоке и других питательных веществах, а также в почве.

Эти микроорганизмы широко используются в производстве молочных продуктов (йогурта, кефира), кормового силоса, засолки овощей, дрожжей, кожевенного дубления, молочной кислоты, в промышленности и в медицине - при лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Ход работы:

Для знакомства с молочнокислыми бактериями препарат готовят из различных молочных продуктов (кефир, простокваша, сметана, творог) и рассолов (помидор, огурец, капустный рассол). Его готовят следующим образом:

1. Для этого каплю воды в стеклянной посуде смешивают с небольшим количеством средства бактериальной петлей, равномерно распределяют над огнем, подсушивают на воздухе у пламени и готовят жир;

2. Над огнем трижды лицом к огню.

3. Поверх смазки пропитанный маслом, линованную бумагу или метиленовую оставляем на две минуты;

4. С помощью петли после того, как жиронепроницаемая бумага была удалена и высушена, на него капают иммерсионное масло и наблюдают за иммерсией в объективе.

Препарат готовят из рассола без воды, затем смазку сушат, закрепляют и так далее.

В препаратах из молочных продуктов рассматриваются сферические молочнокислые бактерии, они относятся к роду *Streptococcus*. Клетки диаметром от 0,5-0,6 мкм до 1 мкм располагаются поодиночке, парами и цепочкой, это представители типичной гомоферментной группы.

Помимо стрептококков, препарат содержит палочковидные бактерии, относящиеся к роду *Lactobacillus*. Например, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* и другие. Клетки одиночные, парные и цепочечные. Молочнокислые палочки о стрептококки встречается на проволоке, в почве, в молочных продуктах, в кишечнике человека и животных.

Палочковидные бактерии *L. plantarum*, расположенные в одиночном и короткоцепочечном положении в препарате, приготовленном из рассола. Они используются для засолки овощей. Молочная кислота играет важную роль в процессе брожения.



Контрольные вопросы:

1. В чем разница между гомоферментным и гетероферментным брожением?
2. Какие виды бактерий содержатся в соленьях?
3. Объясните, как протекает процесс брожения в молочных продуктах под влиянием микроорганизмов.
4. Какие микроорганизмы осуществляют молочнокислое брожение?
5. Объясните, какие микроорганизмы влияют на процесс брожения в молочных продуктах.

Лабораторная работа №18

Тема: Выявление микроорганизмов, вызывающих маслянокислой брожение

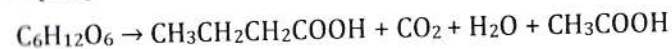
Цель работы: Выявление микроорганизмов, осуществляющих процесс ферментации жирных кислот.

Оборудование: Питательная среда Рашмана, бактериальная петля, ванна, лестница, посуда и покровное стекло, спиртовка, водопроводная вода в колбе, стеклянные палочки, генциан, микроскоп с промасленной фильтровальной бумагой, иммерсионное масло, толуол, образец почвы, электронная доска, световой микроскоп с цифровой камерой и т. д.

Теоретическая информация

Процесс ферментации жирных кислот распространен в природе. В 1861 году Луи Пастер доказал, что это биологический процесс. Процесс осуществляют ферментирующие жирные кислоты бактерии. Являются типичными анаэробами, образуют споры, вегетативные клетки имеют выемчатую форму, прикрепляются к голени, длиной 1-5 нм. Они распространены в природе, портит молоко, сыр, консервы, портит овощи и наносит большой ущерб

народному хозяйству. Но некоторые представители (*Clostr. Pasterianum*, рис. 20) о молекулярном азоте, обогащает почву азотом. В результате брожения образуются следующие основные продукты:



Помимо основных продуктов брожения образуются этиловый спирт и ацетон. Возбудители жирового ацидоза относятся к роду *Clostridium* и представляют собой подвижные палочки, образующие споры клостридиального или плектридиального типа. Одной из характерных особенностей жирнокислых бактерий является накопление гранул в клетках.

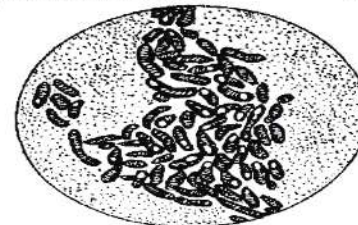


Рисунок 20. *Clostr. pasterianum*

В качестве источника соединений углерода жирнокислые бактерии усваивают моно- и дисахариды. Эти организмы распространены в почве, навозе, загрязненной воде, растительных остатках и растущих растениях. В естественных условиях жирнокислотные бактерии играют важную роль в расщеплении клетчатки и пектина в анаэробных условиях. В некоторых случаях: при молочнокислом брожении жирнокислотное брожение в силос нецелесообразно, в результате чего образуется жирная кислота, придающая продуктам неприятный запах. Однако в промышленности жирные кислоты получают на заводах с использованием чистых культур жирнокислых бактерий.

90% бактерий, обнаруженных в почве, участвуют в процессе ферментации жирных кислот (21-рисунок).

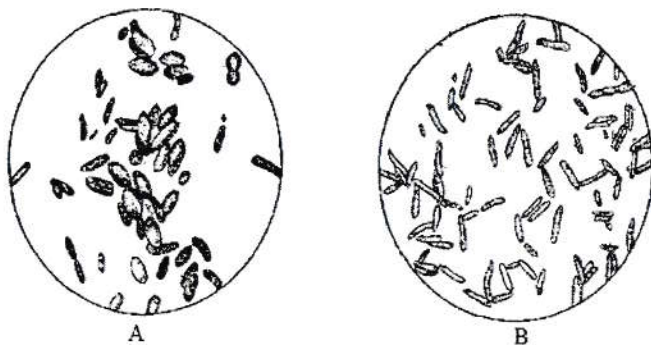


Рисунок 21. А- *Clostridium acetobutyllicum*; Б- *Clostridium butylicum*

Они также могут переваривать различные углеводы, спирты, кислоты, крахмал, гликоген, декстрины. Образующаяся жирная кислота является источником питательных веществ для других организмов. Жирные кислоты также могут образовываться при расщеплении жиров и белков, и даже если образуется небольшое количество жирных кислот, качество пищи ухудшается.

Для селективной культуры жирнокислотных бактерий необходимы следующие условия: анаэробная среда, наличие сахара, подогрев питательной среды до $+100^{\circ}\text{C}$ и добавление в нее небольшого количества почвы. При нагревании питательной среды из нее выделяется кислород и создаются анаэробные условия, при которых большое количество питательного вещества помещают в емкость и выращивают в термостате при $+30^{\circ}\text{C}$ или в теплом помещении.

Ход работы:

Исследование микроорганизмов, осуществляющих ферментацию жирных кислот, проводят в следующем порядке:

1. Почву засевают в питательную среду Рашмана с помощью шпателя и закрывают его рот ватным тампоном;
2. Почву засевают питательной питательной средой Рашмана, инкубируют 1 неделю при температуре $28-30^{\circ}\text{C}$ в термостате;

3. Пробы из инкубируемой среды отбирали соскобом по ленткам картофеля бактериологической петлей, добавляли вместе с жидкостью каплю реактива Люголя в предметное стекло и закрывали покровное стекло;

4. На него капают иммерсионное масло и наблюдают под микроскопом на иммерсионном объективе, т.е. 90 линз;

5. Препарат показывает крупные зернистые клетки, окрашенные в фиолетовый цвет. В зависимости от локализации гранул клетки могут быть целыми, частично полными или зернистыми.

Контрольные вопросы:

1. Какие микроорганизмы осуществляют ферментацию жирных кислот?
2. На какой питательной среде можно выявить микроорганизмы, осуществляющие ферментацию жирных кислот?
3. Каковы плюсы и минусы процесса ферментации жирных кислот?
4. Какие плюсы и минусы процесса ферментации жирных кислот?
5. Какие продукты можно получить из микроорганизмов, осуществляющих ферментацию жирных кислот?
6. Какие условия необходимы для селективного культивирования бактерий, загрязняющих жирные кислоты?
7. Какое вещество является основным источником питательных веществ для микроорганизмов, осуществляющих ферментацию жирных кислот?
8. Что расщепляют жирнокислотные бактерии в анаэробных условиях в естественных условиях?

Лабораторная работа 19

Тема: Выявление живых микроорганизмов, стимулирующие процесс брожения целлюлозы

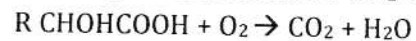
Цель работы: Ознакомление с морфологическим строением микроорганизмов, расщепляющих целлюлозу.

Оборудование: обогащенная среда Гетчинсона и Клейтона, пробирки, бактериальная петля, ванна, лестница, стеклянная посуда, спиртовка, водопроводная вода в пробирке, стеклянные палочки, метиловый синий, фильтровальная бумага, пропитанная генцианвиолетом, микроскоп, иммерсионное масло, толуол, электронная доска, световой микроскоп с цифровой камерой и т. д.

Теоретическая информация

Клетчатка (целлюлоза) составляет 45-80% сухой массы растения. Это полисахарид, который трудно расщепить даже под воздействием сильных химических реагентов. В природных условиях очень большое количество клетчатки попадает в почву, где подвергается биологическим изменениям с помощью почвенных микроорганизмов. Эти микроорганизмы продуцируют ферменты целлюлазы и целлюлозы, которые гидролизуют клетчатку до глюкозы, а затем окисляют ее до CO_2 и H_2O в аэробных условиях.

Образуются промежуточное качество продукта органические кислоты.



Аэробное расщепление целлюлозы происходит в основном в присутствии бактерий, а также актиномицетов и грибов. Основная роль в этом процессе принадлежит микобактериям. Микобактерии представляют собой грамотрицательные одноклеточные палочки шириной от 0,4 до 0,7 мкм. У большинства этих организмов удлинённые, вытянутые,

заостренные концы. Они отличаются своей гибкостью и скользят по твердым поверхностям. Микобактерии размножаются делением на бинарно-поперечные деления. После размножения вегетативных клеток ряд клеток объединяется, покрывается слизистой оболочкой и образует бесцветные или дифференцированные плодовые тела размером менее 1 мм. Плодовое тело микобактерий состоит из ножек (цистофер) и цисты. Кисты содержат крупные покоящиеся клетки, которые при созревании производят больше вегетативных клеток.

Микобактерии объединяют в несколько видов: *Cytophaga*, *Sporocytophaga*, *Sorangium*, *Archangium*, *Polyangium*. Эти организмы обитают в почвах, где в большом количестве содержатся в навозе и удобренных навозом почвах, а также в пресноводных водоемах и морских тинах. Аэробное разложение целлюлозы можно наблюдать в среде Гетчинсона и Клейтона (1 л дистиллированной воды, K_2HPO_4 - 1 гр., $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,1 гр., $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3 гр., NaCl - 0,1 гр., $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,01 гр., NaNO_3 - 2,5 - 2,5 гр.).

Это является единственным источником углерода в дрожжах и служит целлюлозно-фильтровальной бумагой. Почву высевают на среду и через 14 - 21 день наблюдают изменения на фильтровальной бумаге. В результате бактериальной гнили бумага становится рыхлой, пористой, в некоторых случаях рвется. Бумага на границе воздуха с жидкостью становится слизистой, желтоватой, коричневой, что связано с развитием колоний микобактерий.

Ход работы:

Для ознакомления с аэробными целлюлоза-разрушающими бактериями готовят препарат «измельченная капля». для этого необходима следующая работа:

1. Образец почвы высаживают на питательную среду Гетчинсона и Клейтона с помощью шпателя, ватную пробку

закрывают и инкубируют в термостате при 28–30°C в течение одной недели;

2. В стакан прибора добавляют каплю водного раствора метиленового синего и отбирают пробу метиленового синего соскобом с помощью бактериологической петли со слизистой части фильтровальной бумаги, разрезанной между жидкостью и воздухом в питательной среде;

3. Покровное стекло закрывают, капают иммерсионное масло и наблюдают под микроскопом с объективом $\times 90$ в иммерсионной системе;

4. В нем можно увидеть волокна гнилой бумаги, отдельные бактериальные клетки и круглые кисты.



Контрольные вопросы:

1. Какие микроорганизмы участвуют в расщеплении клетчатки?
2. Какие ферменты выделяют микроорганизмы, расщепляющие целлюлозу?
3. Какие микроорганизмы в основном участвуют в аэробном расщеплении целлюлозы?
4. В зависимости от каких свойств миксобактерий объединяются в систематические группы?
5. Сколько видов миксобактерий объединяется?
6. Объясните, состав питательной среды Гетчинсона и Клейтона?
7. Какой препарат готовят для знакомства с аэробными целлюлоза разрушающими бактериями?
8. В каких средах в основном распространены микроорганизмы, разлагающие целлюлозу?

Лабораторная работа №20

Тема: Выявление микроорганизмов, вызывающих уксуснокислого брожения

Цель работы: Введение в морфологическую структуру уксуснокислотных микроорганизмов.

Инструменты и оборудование: конические колбы, пиво, сахар, раствор йода, раствор соли FeCl_3 , кристаллическая сода для нейтрализации раствора, фильтровальная бумага, иммерсионное масло, толуол, фуксин, спиртовка, микроскоп, электронная доска, световой микроскоп с цифровой камерой и др.

Теоретическая информация

Чтобы бактерии, участвующие в уксуснокислом брожении, процветали, необходимо поддерживать определенное соотношение между уровнем кислотности и температурой. Например, необходимо поддерживать определенное соотношение между температурами. При температуре 40, 35, 30, 25, 20 и 15°C количество кислоты в растворе должно быть 0,5, 10, 15, 20, 25% соответственно.

Ход работы:

1. Для этого возьмите 4 конические колбы, налейте в каждую из них по 50 мл пива и растопите 2 г сахара.
 2. Первую и вторую трубки не трогаем.
 3. Уксусную кислоту добавляют до тех пор, пока раствор в третьей пробирке не достигнет 20%. Первую и третью пробирки хранят в термостате при температуре +30°C, а вторую и четвертую пробирки хранят при комнатной температуре.
 4. Из-за неравномерной кислотности и температуры растворов в колбах развивается тип уксуснокислого брожения.
- Эти бактерии отличаются друг от друга в зависимости от типа роста образованных ими оболочек:

1. Бактерии под названием *Acetobacter Acetate* (ацетат ацетобактерий) образуют слизистоподобную гладкую оболочку. Их мембрана поднимается к стенке пробирки и желтеет под действием йода.

2. Бактерия под названием *Acetobacter ransens* (Ацетобактер рансенс) образует сернамную мембрану. Их мембрана также поднимается к стенке пробирки и желтеет под действием йода.

3. Оболочка бактерии *Acetobacter pasteurianum* (Ацетобактерии пастерианум) сухая, шероховатая и под действием йода мокнет.

4. Оболочка бактерии *Acetobacter kutzingianum* (Ацетобактер кутцингианум) слизистая гладкая, приподнимается к стенке пробирки и синееет под действием йода.

Бактериальные мембраны исследуют на характер роста и окрашивание йодом:

1. Определяют наличие уксусной кислоты в растворе.

2. Для этого жидкость из пробирки нейтрализуют кристалликами соды и приливают к ней раствор соли $FeCl_3$, в результате чего получается красновато-бурая окраска.

3. Такое изменение окраски раствора свидетельствует о наличии уксусной кислоты. Смазку готовят, берут небольшой кусочек бактерий с мембраны, прикрепленной к стенке трубки.

4. Окрашивают фуксином после фиксации в спиртовке и затем наблюдают под микроскопом.



Контрольные вопросы:

1. Какие микроорганизмы вызывают уксуснокислое брожение?

2. Знаете ли вы какие-нибудь бактерии, которые производят уксуснокислое брожение?

3. Как проверить характер роста бактерий и окрашивание йодом?

4. Что вызывает рост ацетата *acetobacter*?

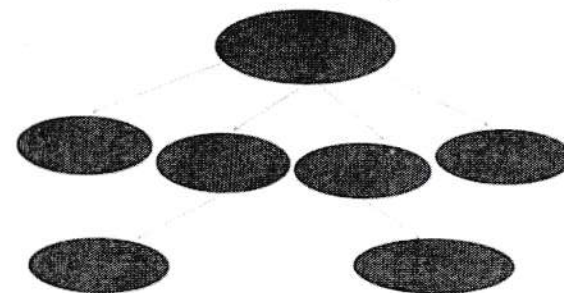
5. Какова специфичность *Acetobacter*?

6. Что вызывает *Acetobacter ransens*?

7. Какие условия необходимы для хорошего развития бактерий, участвующих в уксуснокислом брожении?

8. Для каких целей можно использовать микроорганизмы, осуществляющие уксуснокислое брожение?

Метод «Кластер»



1. Создайте кластер по типу брожения и обоснуйте свои ответы.

2. Создайте кластер по степени важности брожения и обоснуйте его.

Лабораторная работа № 21

Тема: Получение селективной культуры анаэробных микроорганизмов, усваивающие молекулярного азота

Цель работы: Изучение приготовления селективной культуры бактерий.

Инструменты и оборудование: Чашки Петри, почва, индентор, сахар и глюкоза, краситель эритрозин, растворенный в карболовой кислоте, бактериальная петля, ванна, лестница,

посуда и покровное стекло, спиртовка, водопроводная вода в колбе, стеклянные палочки, метиловый синий, масло генцианвиолетового бо. -пропитанная фильтровальная бумага, микроскоп, иммерсионное масло, толуол, электронная доска, световой микроскоп с цифровой камерой и т. д.

Теоретическая информация

75—80 % воздуха составляет азот, 21—23,2 % — кислород, а остальные 1,3 % — другие инертные газы, которые не могут усваиваться. Поэтому для обеспечения азотом сельскохозяйственных культур почву удобряют искусственными удобрениями, содержащими азот. Однако было обнаружено, что молекулярный азот в природе усваивается некоторыми сине-зелеными водорослями (в том числе *Nostok muscorum*) и некоторыми бактериями. Наличие бактерий, усваивающих молекулярный азот, впервые обнаружил в 1893 году русский ученый С. Н. Виноградский, назвав их *Clostridium pasteurianum*. Это спорообразующая бацилла палочковидной формы, и на стадии спорообразования ее вегетативная клетка напоминает герцога.

Ход работы:

Элективную культуру бактерий рода Кластридии готовят следующим образом:

1) Добавьте 100 г почвы в 40-60 мл воды, растворенной в 1 г глюкозы, и перемешивайте, пока она не станет мутной.

2) Смесь выливают в чашку Петри с помощью шпателя, разглаживают и накрывают крышкой, затем выдерживают в термостате при +30 оС в течение нескольких суток.

3) Затем откройте крышку чашки Петри и понюхайте смесь.

4) Из-за выделения газов при жирнокислотном брожении глина также пенится. Все эти процессы происходят в результате жизнедеятельности клостиридий.

5) Возьмите немного пенящейся грязи, разведите ее водой и сделайте из нее смазку.

6) Фиксируется спиртом в течение 5 минут после высыхания.

7) После того, как жир испарится, для окрашивания бактерий добавляют краситель эритрозин, растворенный в карболовой кислоте (феноле).

8) Через несколько минут краска смывается, смазка высушивается и наблюдают в микроскоп через иммерсионный объектив. В этом препарате появляются бактерии в виде длинных палочек и дуцисов.

9) В рабочую тетрадь заносят клетки наблюдаемого микроорганизма и подводят итоги работы.

Контрольные вопросы:

1. Какие живые организмы удаляют молекулярный азот из атмосферы?

2. Какой ученый выдвинул идею о том, что существуют микроорганизмы, способные инфицировать?

3. Какие еще микроорганизмы кроме бактерий используют азот?

4. Объясните, как получают электростатическую культуру бактерий *Colstridium*.

5. Какой учёный высказал мысль о том, что существуют микроорганизмы способные поглощать молекулярный азот из атмосферы.

6. Какие ещё микроорганизмы кроме бактерий обладают способностью усваивать азот?

7. Объясните, как получают электоростатическую культуру бактерий *Clostridium*?

8. Объясните значение фиксации азота для природы и человека.

Лабораторная работа №22

Тема: Аэробные азотфиксирующие микроорганизмы по выбору подготовка культуры

Цель работы: Исследование приготовления элективной культуры азотобактера.

Инструменты и реагенты: Чашка Петри, почва, шпатель, маннит или глицерин, эритрозин, растворенный в карболовой кислоте.масло, посуда, кедровое масло, спиртовка, бактериальная петля, электронная доска, световой микроскоп с цифровой камерой и т.д.

Теоретическая информация

Молекулярный азот воздуха не может усваиваться зелеными растениями и животными. Азот участвует в биологическом превращении веществ двумя путями.

Во время электрического разряда на первой дорожке(при наличии сильной молнии) происходит фотохимическое окисление, при котором N_2 превращается в $\rightarrow NO_2$. Образовавшийся NO_2 повторно окисляется в воде и почве до NO_3 . Таким же образом за год на 1 м² площади собирается 30 мг NO_3 .

Молекулярный азот на втором путиассимилирует азотфиксирующие микроорганизмы. Они делятся на две группы:

1. Азотистые бактерии живут в симбиозе с бобовыми и усваивают азот в молекулярном состоянии.

2. Свободноживущие азотфиксаторы поглощают азот.

Родные бактерии. М. С. Воронин (1886) обнаружил наличие микроорганизмов в корнях бобовых культур. Немецкие ученые Г. Гельригель и Т. Вильфорт (1886) посадили бобовое растение в нагретый песок (т. е. все бактерии погибли) и заметили, что на его корнях не образуются клубни. Затем эти бактерии выделяют в чистом виде голландские ученые М.

Бейеринк и Бакт. называется радикалой. Сейчас эти бактерии включены в род *Rhizobium*. Кроме *азотобактер* присутствует ряд свободных азотфиксирующих микроорганизмов этих микроорганизмов в природе периодического круговорота азота и сельскохозяйственных культур. Это важно для обогащения почвы азотом. ох уж эти микроорганизмы требует ангажированного подхода.

Ход работы:

Азотобактерии. Распределение производится следующим образом:

1. К 2 г почвы примешивают 2 г маннита или глицерина. Влейте немного воды в эту смесь и замесите тесто.

2. Поместите его в чашку Петри и отшлифуйте сверху шпателем. Накройте крышкой чашку Петри и храните в термостате при 30°C в течение нескольких недель.

3. На поверхности глины в чашке Петри видны белые блестящие колонии, впоследствии буреющие.

4. Возьмите лак, разбавьте его 1-2 каплями воды и сделайте из этой жидкости мазь. Смазку высушивают и фиксируют спиртом в течение 5 минут. К неподвижной смазке по каплям добавляют эритрозиновый краситель, растворенный в карболовой кислоте.

5. Смазку промывают, сушат и в иммерсионную среду добавляют каплю кедрового масла. В этом случае под действием эритрозинов образуются только азотобактерии, не окрашивающие почвенные частицы, можно увидеть лежащим.

6. Этот препарат содержит *Azotobacter chroococcum* и появляются капсулы. *Azotobacter chroococcum* в молодом возрасте встречается в виде палочек. Они подвижны, перитричны, гомогенно окрашены в плазму, одиночно или парами. Их длина может колебаться от 2-3 до 4-6 мкм. Постепенно палочки становятся крупными, шаровидными диаметром до 4 мкм, часто близнецовые клетки,

напоминающие цифру 8, по мере старения клетки теряют подвижность и становятся слизистыми, покрытыми капсулой, а плазма становится зернистой.

2 Контрольные вопросы:

1. Биологический азот атмосферного азота. Какими способами это делается?
2. Какие микроорганизмы, живущие в аэробных условиях, выделяют свободный азот?
3. Как выделяют азотобактерии?
4. Объясните строение бактерии *Azotobacter chroococcum* /
5. Какой учёный обнаружил наличие микроорганизмов в корнях бобовых культур?
6. Какие микроорганизмы выделили немецкие учёные Г. Гельригелль и Т. Вильфорт?

Лабораторная работа №23

Тема: Выявление почвенных азотфиксирующих микроорганизмов

Цель работы: Обнаружение микроорганизмов в элективной культуре.

Инструменты и оборудование: чашки Петри, почва, шпатель, сахар и глюкоза, эритрозин, растворенный в карболовой кислоте, масло, бактериальная петля, ванна, лестница, стеклянная посуда, спиртовка, водопроводная вода в колбе, стеклянные палочки, метиловый синий, фильтровальная бумага, пропитанная генцианвиолетом, микроскоп с окуляром, иммерсионное масло, толуол, электронная доска, световая микроскопия с цифровой камерой, и т. д.

Теоретическая информация

Запасы газообразного азота в атмосфере неисчерпаемы. Но ей нужны минеральные соединения азота из этого большого запаса. Растения и животные, усваивающие азот в виде органических соединений, не могут его использовать.

Такой особенностью обладают только прокариоты. Их сотрудничество. Представители вида переводят азот воздуха в связанное состояние. Процесс усвоения микроорганизмами молекулярного азота называется азотфиксацией, а микроорганизмы, осуществляющие этот процесс, - азотфиксаторами. Все признанные фиксаторы азота включают азотобактерии, эндогенные бактерии и анаэробные клостридии. В других группах микроорганизмов обнаружены азотфиксаторы, принадлежащие к родам *Bacillus*, *Azotobacter*, *Azospirillum* и др.

Азотфиксирующие микроорганизмы свободно растут в почве или при высокой температуре. Живет в симбиозе со струнами. Следовательно, свободноживущие и симбиотические живые азотфиксаторы различаются.

Среди свободноживущих азотфиксаторов интерес представляют представители родов *Azotobacter* и *Clostridium*. Азотобактерии распространены в почвах с нейтральной или слабощелочной реакцией, которые удерживают легкоусвояемые органические вещества. Все виды азотобактерий являются гетеротрофами и аэробами. Наиболее изученным среди них является *Az. chroococcum* и *Az.* являются сортами винеландии.

Анаэробный фиксатор азота *Clostridium* встречается в почвах и загрязненных водоемах. Типичным представителем этой группы является вид *C. pasteurianum*. Молодые клетки культуры имеют ульи, расположенные в перитриксе. Имеет палочковидную форму с большим запасом зернистого и

зернистого крахмала. Клетки образуют споры кластридального типа.

Существуют различные способы выделения азотобактера из естественной среды обитания – из почвы и определения его количества, в том числе почвенного используется метод лаков. Выполняется это в следующей последовательности:

Ход работы:

1. Безазотную агаризованную среду Эшби разливают в стерилизованную чашку Петри. После заморозки. Стерильной петлей или шпателем на 1 г агара помещают 50-100 кусочков почвы диаметром 2 мм.

2. Почву предварительно слегка увлажняют и перемешивают до образования пасты.

3. Шаблон используется для правильного расположения лаков.

4. Почвенные засеянные пластины помещают во влажную камеру на 5-7 дней при температуре 28-30 °С. Быть азотобактером в таких условиях. Если да, то частицы бледные, сначала бесцветные, затем покрыты светло-коричневой или темно-темной слизью.

5. Почва, покрытая азотобактером. Количество лаков рассчитывают в процентах от общего количества засаженных участков.

6. Полуденный препарат готовят из слизистой биомассы вокруг частиц и исследуют под микроскопом. В данном случае зернистая культура, окруженная толстой бесцветной капсулой на темном фоне. появляются клетки хроококка.

Обогащенную культуру азотобактера можно получить и при посеве почвы на жидкую безазотистую среду Эшби. Высаживают при температуре 28-30°С. выделяется и анализируется через неделю:

1. Наличие мутной и кольцевидной слизистой пыли на стенке пробирки

2. Культуральная жидкость и кольцевая пыль под микроскопом в капле

Познакомиться с чистой культурой свободноживущего фиксатора азота. Лабораторные культуры стерилизованных *Azotobacter chroococcum* видны под микроскопом.

Для этого в стакан днем добавляют 1-2 капли воды, разбавленной в соотношении 1:10, с бактериальной петлей в среде Эшби. Стерилизованный *Azotobacter chroococcum* смешивают с водой, взятой из чистой культуры. Покровное стекло закрывают на подготовленную мутность и наблюдают в иммерсионной среде микроскопа.

Азотобактерия хроококк в виде палочки в молодом возрасте. Они подвижны, перитрихозны, гомогенно окрашены в плазму, одиночно или парами. Их длина может колебаться от 2-3 до 4-6 мкм. Постепенно палочки становятся крупными, шаровидными диаметром до 4 мкм, нередко превращаясь в двойные клетки, напоминающие цифру 8, по мере того как клетки теряют подвижность и покрываются слизистой капсулой, плазма становится зернистой.



Контрольные вопросы:

1. Какие микроорганизмы осуществляют процесс азотфиксации?
2. Что относится к свободноживущим аэробным азотфиксирующим микроорганизмам?
3. Азотобактерия хроококк объяснить, как получают обогащенную культуру бактерии.
4. Объясните процесс фиксации азота и его значение.
5. Какой препарат готовят, чтобы увидеть бактерию *Azotobacter chroococcum* под микроскопом?
6. Объясните процесс фиксации азота и его важность.
7. Как получить обогащенную культуру азотобактера
8. Какова цель метода почвенных частиц?

Лабораторная работа №24

Тема: Изучение азотфиксирующих микроорганизмов, живущих в симбиозе

Цель работы: Сформировать представление учащихся об азотфиксирующих микроорганизмах, живущих симбиоз.

Инструменты и оборудование: Чашки Петри, лопатка, мош, корень фасоли и клевера, бактериальная петля, кадка, лестница, посуда и покровное стекло, спиртовка, водопроводная вода в колбе, стеклянные палочки, метиловый спирт. Фильтровальная бумага, пропитанная генцианвиолетом, микроскоп сновидений, иммерсионное масло, толуол, электронная доска, световой микроскоп с цифровой камерой, электронная доска, световой микроскоп с цифровой камерой и другие.

Теоретическая информация

Клубеньковые бактерии живут в симбиозе с бобовыми растениями. Вот почему бактерии так называются — когда они перемещаются к корню растения, ткань корня разрастается и образует клубень.

Клубеньковые бактерии относятся к роду *Rhizobium*. Бактерии в основном о «В зависимости от образования пучков на нитях вид назван в честь этого растения: *Rh. Phaseoli* (фасоль), *Rh. trifolii* (клевер), *Rh. meliloti* (люцерна), *Rh. leguminosarum* (горох).

Азотистые бактерии обычно находятся в почве. Это маленькие подвижные граммотрицательные палочки длиной не более 3 мкм, очень похожа на псевдомонады. По мере роста семян растений эндемичные бактерии сталкиваются с корневыми волосками. Повреждение корневой системы растений происходит только через молодые корневые волоски. Бактерии проникают с самого кончика волосяных фолликулов и растут в виде нити, нити, называемой инфекционной нитью, которая затем переходит от клеточной

стенки эпидермиса к коре корня. Они разветвлены и распределены по тетраплоидным клеткам ткани корня. Под влиянием ризобий и в присутствии стимулятора роста происходит разрастание корневой ткани, в результате чего образуются клубеньки. В клубнях бактерии быстро размножаются, увеличиваются в размерах и меняют форму: от палочек до колбасно-набухших клеток - бактериоидов. Форма и размер стеблей разных бобовых различны.

Ход работы:

1. Для ознакомления с симбиотическими азотфиксирующими микроорганизмами. Общий вид корня таких бобовых культур, как буквица, фитиль, соя, люпин, нарисован с концами.
2. Получение резус-бактерий. *melilot* готовят из 3-4-дневной культуры. Это мелкие подвижные палочки размером 0,5-0,6 x 1,2-3 мкм, не образующие спор, граммотрицательные.
3. Для ознакомления с бактериоидами в пробирках капают каплю воды на поверхность стакана и ставят на него стакан и плотно прижимают вторым стаканом.
4. Так раствор удаляют, смешивая его с водой, и из микроорганизмов, содержащихся в жидкости, готовят фиксированно окрашенный препарат и наблюдают под микроскопом.
5. Бактериоиды в препарате - неподвижные, утолщенные, тонкие, а также цилиндрические набухшие, вредные или шаровидные клетки. Риниши должен.
6. Запишите результаты наблюдения в рабочую тетрадь.

Контрольные вопросы:

1. Какие микроорганизмы входят в состав симбиотических азотфиксаторов?
2. Что такое бактерии и как они образуются? Объяснить
3. Как называется готовая культура бактерий?

4. Что такое заразная нить и каково ее значение?
5. Как изучать симбиотические азотфиксирующие микроорганизмы?
6. Почему все бактерии прикрепляются к линии ризобий?
7. Объясните значение эндогенных бактерий для растений
8. Какие растения следует использовать для изучения с симбиотическими азотфиксирующими микроорганизмами?

Лабораторная работа №25

Тема: Выявление бактерий, вызывающих процесс нитрификации

Цель работы: Изучение бактерии, участвующие в процессе нитрификации.

Инструменты и оборудование: бактериальная петля, ванна, лестница, посуда и покровное стекло, спиртовка, водопроводная вода в колбе, стеклянные палочки, метиловый спирт, фильтровальная бумага, пропитанная генцианвиолетом, микроскоп, иммерсионное масло, толуол, фарфоровая пластинка, среда Виноградского, реактив Грисса, электронная доска, световой микроскоп с цифровой камерой и др.

Теоретическая информация

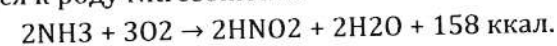
Образуется при микробном разложении азотистых органических соединений. Аммиак претерпевает в почве различные изменения: окисляется до нитритов и нитратов, частично адсорбируется на почве, используется как источник азота в процессе метаболизма почвенных микроорганизмов (иммобилизация) и др.

Как упоминалось выше, аммиак восстанавливается до нитритов и так далее. Окисление до нитратов называется нитрификацией. Процесс нитрификации осуществляется с помощью нитрифицирующих бактерий. Эти бактерии являются автотрофными и, как правило, используют

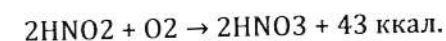
углекислый газ в качестве источника углерода. Необходимая для этого химическая энергия получается при окислении аммиака и нитритов. В современной терминологии их называют гемолитоавтотрофами.

Процесс нитрификации проходит в две стадии. Каждая стадия осуществляется грамотрицательными мелкими клетками, представляющими собой специфические группы нитрифицирующих бактерий.

На первом этапе аммиак окисляется нитробактериями, относящимися к роду *Nitrosomonas*:



На втором этапе нитриты окисляются с помощью нитратных бактерий, принадлежащих к семейству нитробактерий:



Ход работы:

Процесс нитрификации. Исследование проводится следующим образом:

1. Для получения обогащенной культуры нитрифицирующих бактерий почву (или другой субстрат) высевают на питательную среду Виноградского. Эта среда состоит из раствора минеральных солей, в том числе раствора соли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. (См. раздел «Питательные вещества»).

2. Через определенный инкубационный период (21 день) анализируют обогащенную культуру нитрифицирующих бактерий.

3. Обогащенную культуру фиксируют под микроскопом и окрашивают генцианвиолетом. Приготовлено ложное лекарство.

4. Образуются нитриты. Определяют качественной реакцией с реактивом Грисса.

5. Для этого в фарфоровую посуду наливают 0,5-1 мл обогащенной культуры и добавляют 1-2 капли реактива Грисса. Образование темно-красного цвета свидетельствует о наличии нитритов.

6. Качественная реакция на нитраты - нитраты определяют с использованием концентрированного реагента дифениламина серной кислоты.

7. Для этого в фарфоровую посуду наливают 0,5-1 мл обогащенной культуры. Добавляют 1-2 капли реагента в год. Если накопились нитраты, на стыке жидкостей наблюдается интенсивная синяя окраска.



Контрольные вопросы:

1. Что такое нитрификация и каково ее значение?
2. Объясните, какие нитрифицирующие микроорганизмы проникают?
3. На какой питательной среде получают обогащенную культуру нитрифицирующих микроорганизмов?
4. В какой момент происходит подкормка нитрифицирующих микроорганизмов?
5. С помощью какой реакции можно определить образование нитритов?
6. С помощью какой реакции можно определить образование нитратов?
7. Объясните состав питательной среды винограда
8. Сколько дней должен быть инкубационный период для анализа обогащённой культуры нитрифицирующих бактерий?

Лабораторная работа №26

Тема: Приготовление питательной среды для выделения денитрифицирующих микроорганизмов

Цель работы: Приготовление питательной среды Гилтая для денитрификаторов и изучение микроорганизмов, обладающих этим свойством.

Инструменты и оборудование: цитрат натрия, KNO_3 ; пептон; KH_2PO_4 ; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; FeCl_3 -след, 1% спирт соБромтимоловый индикатор светлого цвета, пробирки, пробирки, водопроводная вода, термостат, автоклав, весы, воронка, электронная доска, световой микроскоп с цифровой камерой и др.

Теоретическая информация

Процесс денитрификации противоположен процессу нитрификации, при котором связанный азот свободно возвращается в атмосферу. Этот процесс бывает прямым и косвенным, так как молекулярный азот может образовываться из нитратов в результате совершенно разных процессов.

При прямой денитрификации нитраты возвращаются за счет жизнедеятельности определенной группы денитрифицирующих бактерий, тогда как при непрямо́й денитрификации с аминокислотами взаимодействует только азотная кислота. Результат также образуется молекулярный азот'леди. Непосредственная денитрификация происходит в природе за счет жизнедеятельности денитрифицирующих бактерий, распространенных в почве, навозе и водоемах.

Ход работы:

Денитрифицирующие микроорганизмы. Необходимо изучить питательную среду Гилтая готовят следующим образом:

1. Цитрат натрия на 1 л дистиллированной воды (г/л) - 2,5; KNO_3 -2; пептон-1; KH_2PO_4 -2; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -2; $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

- 0,2; Соль FeCl_3 экстрагируют и переносят в колбу вместимостью 1 л, затем в среду добавляют 1–2 мл 1%-ного спирта. Добавляют бромтимоловый индикатор цвета к, пока он не станет зеленым.

2. Приготовленную полученную среду разливают в пробирки (5–10 мл), пробирки закрывают ватным тампоном и стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм.

3. В испытуемую среду шпателем добавляют 0,5 - 0,7 г почвы.

4. Соедините пробирки с помощью бумаги, на которой написаны дата посева и название сажалки. Инкубацию проводят в термостате при t 25–28°C в течение 7–21 суток.

5. Исследуемые микроорганизмы сначала высевают в пробирки объемом 5 мл (пассаж 1). Посев осуществляют инъекционным способом.

6. Через 24 часа с 1-го пассажа культуру снимают с бактериальной петли, нагревают и затем переносят в 10 мл раствора среды, охлажденного до 40–45°C. После посева среду перемешивают, охлаждают и добавляют 2–3 мл стерильного 1%-ного водного агара для создания анаэробных условий.

7. Развитие бактерий с денитрифицирующими свойствами сопровождается помутнением среды и газовой выделением.

8. Запишите результаты наблюдения в рабочую тетрадь.

? Контрольные вопросы:

1. Как осуществляется процесс денитрификации?
2. На какой питательной среде можно выделить денитрифицирующие микроорганизмы?
3. Где в природе происходят процессы денитрификации?
4. Объясните, что входит в состав питательной среды Гилтая.
5. Объясните, какие микроорганизмы входят в состав денитрифицирующих микроорганизмов?

6. Что такое анализ питательной среды?

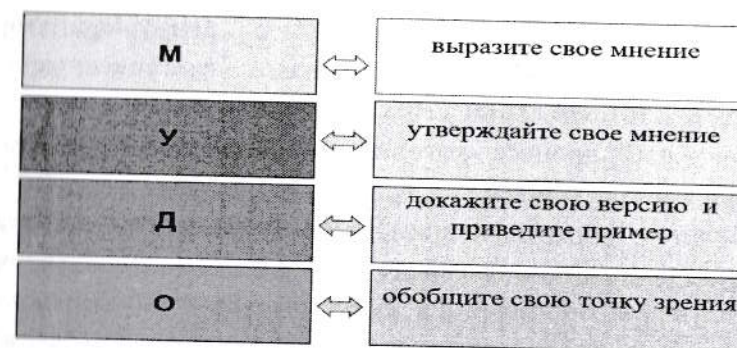
7. Где в природе происходят процессы денитрификации?

8. Что нужно сделать, чтобы остановить процесс денитрификации?

Метод "МУДО"

Цель технологии: Данная технология используется для закрепления пройденной темы. Делать личные выводы из идей, сравнивать и противопоставлять, усваивать информацию путём обобщения, а также формировать навыки самостоятельного творческого мышления.

Используется эта технология на лекциях, закреплении, задании вопросов, домашних заданий и анализе результатов практических занятий.



Лабораторная работа №27

Тема: Изучение денитрифицирующих микроорганизмов с помощью микроскопа.

Цель работы: Изучить бактерии, участвующие в процессе денитрификации.

Инструменты и оборудование: бактериальная петля, ванна, лестница, посуда и покровное стекло, спиртовка, водопроводная вода в колбе, стеклянные палочки, метиловый спирт, фильтровальная бумага, пропитанная красителем

генцианвиолет, микроскоп, иммерсионное масло, толуол, фарфоровая пластинка, среда Гилтея, реактив Грисса.

Теоретическая информация

Восстановление солей азота до молекулярного азота называется истинной денитрификацией. Этот процесс осуществляется денитрифицирующими микроорганизмами, которые используют нитраты в качестве акцепторов водорода в процессе окисления органического вещества.

Только гетеротрофные микроорганизмы обладают денитрифицирующими свойствами. Как наиболее активные денитрификаторы *псевдомонада* беспоровые бактерии. В этот процесс могут быть вовлечены некоторые мезофильные и термофильные виды, принадлежащие к роду *Bacillus*. Конкретные автотрофные денитрификаторы включают *Thiobacillus denitrificans*, азотфиксирующую бактерию при окислении серы. Денитрификация в почве — неправильный процесс, который приводит к потере азота, усваиваемого растением.

Процесс денитрификации. Почву (или другой субстрат) высевают на питательную среду Гилтея, которую электризуют, для получения обогащенной культуры денитрифицирующих бактерий для исследования. Эта питательная среда содержит натрий-лимонную кислоту, пептоны, нитраты и минеральные соли, а также индикатор бромтимол синий, имеющий мощную окраску. Через семь дней корм гильтай анализируют.

Ход работы:

Анализ обогащенной культуры денитрификаторов на питательной среде Giltay.

1. Наблюдение невооруженным глазом - наличие пленки (внешний вид), интенсивность помутнения, наличие пузырьков воздуха и изменение окраски питательной среды.

2. Денитрификатор обогащенная культура бактерий под микроскопом - живой препарат "дробленая капля". Готовится фиксированный окрашенный препарат.

3. Денитрификатор фиксируется из чистых культур микроорганизмов. Готовят ложный препарат и наблюдают под микроскопом с использованием иммерсионной среды. Они перечислены ниже.

II. Денитрификация чистых культур ловчих бактерий:

а) *Pseudomonas stutzeri* - Клетки одиночные, 0,5-1 x 1,5-4 мкм, подвижные, полярные, грамотрицательные, аэробные, хемоорганотрофные, без образования растворимого пигмента.

б) *Pseudomonas fluorescens* - выделяет синий флуоресцентный пигмент. Это тонкие 0,6x1-2 мкм прямые, подвижные (монотриксы), беспорные, хемоорганотрофные палочки.



Контрольные вопросы:

1. Что такое денитрификация?
2. Какие наиболее активные денитрифицирующие микроорганизмы?
3. Почему процесс денитрификации в почве нецелесообразен?
4. Что следует учитывать при анализе питательной среды Giltay?
5. Каким свойством обладает бактерия *Pseudomonas stutzeri*?
6. Какова природа бактерии *Pseudomonas fluorescens*?
7. Как получить чистую культуру денитрифицирующих микроорганизмов?
8. Какие препараты готовят для микроскопического исследования обогащенных культур денитрифицирующих бактерий?

Лабораторная работа №28

Тема: Изучение вирусов, вызывающих заболевания человека и животных, на основе таблиц и рисунков.

Цель работы: Узнайте о симптомах вирусных заболеваний человека и животных.

Инструменты и оборудование, используемые в работе: Плакаты, таблицы, брошюры, документальные фильмы и т. д., содержащие информацию о симптомах вирусных заболеваний человека и животных.

Теоретическая информация

В последние годы в нашей стране принят ряд мер, направленных на поддержание санитарно-эпидемиологического мира, обеспечение безопасности окружающей среды и здоровья человека, совершенствование системы служб санитарно-эпидемиологического надзора, подготовку квалифицированных кадров в этой области. Принято, в том числе в 2019 году Основной программой является Указ Президента Республики Узбекистан «О мерах по коренному совершенствованию системы санитарно-эпидемиологического обслуживания в Республике Узбекистан».

Вирус гриппа, его особенности и распространенность: передается через капли жидкости, которые выделяются в воздух при чихании, кашле и разговоре (рис. 22). Вирус гриппа вызывает «вторичные заболевания», такие как бронхит и плеврит.

Морфологические и культурные особенности. Вирус гриппа имеет сферическую форму и растет в куриных эмбрионах и культурах тканей.

Антигенные свойства и тип. Вирус гриппа делится на 4 типа (A, B, C, D) по антигенности. Антиген вируса гриппа является растворимым. Этот антиген долго хранится, разлагается при 100°C (Ю. Ахмаджанов, 1964). Этот антиген

состоит из рибонуклеопротеина и специфичен для типа вируса, но антигенность вируса варьируется. Если вирус гриппа ослаблен и иммунизирован им, в организме вырабатываются иммунные вещества – антитела. Иммунное вещество образуется в результате заболевания против растворимой части вируса - антигена.

Токсичность. Токсины вируса гриппа были испытаны на животных. При попадании вируса в глаза кролика или морской свинки под действием токсина в глазу возникает кератит. Если вирус гриппа вырастить в эмбрионе яйца и ввести в кровоток и мозг мыши из аллантоисной жидкости, мышь будет отравлена и умрет в течение 24 часов.

Токсины вируса гриппа также обнаруживаются в крови человека на ранних стадиях гриппа. Этот токсин зависит от природы вирусной частицы. В зависимости от типа вируса различаются и его токсины, они нейтрализуются соответствующей иммуномодулирующей (гомологичной) сывороткой.

Токсин вируса гриппа нейтрализуется сывороткой переболевших гриппом.

Долговечность. Вирус гриппа непереносим и погибает в течение нескольких часов при комнатной температуре. При замораживании этот вирус сохраняет свою вирулентность в течение нескольких месяцев. Если лиофил высушить в вакууме и хранить при низкой температуре, вирус может сохраняться в течение нескольких лет. При 65°C вирус гриппа погибает через 5–10 мин. Он устойчив к щелочным и кислым средам, эфирному воздействию и дезинфицирующим средствам. Ультрафиолет чувствителен к воздействию ультразвука, глицерин может храниться несколько месяцев.

Патогенность и патогенез. Вирус гриппа является возбудителем белых мышей, белых крыс и клеток белой

гнили. Поражает дыхательные пути животных. Вирус легко передается ящерицам и другим животным.

Возбудитель пневмотропного вируса попадает к человеку через верхние дыхательные пути с воздухом, размножается в слизистой оболочке и вызывает некроз клеток цилиндрического эпителия, при этом вирус поражает и весь организм. Затем вирус может распространиться на другие части дыхательных путей и достичь бронхов и альвеол.

Клинические признаки. При гриппе инкубационный период обычно длится 2-10 часов (иногда 48 часов и более).

Симптомами болезни являются выраженная интоксикация и воспаление дыхательных путей, в типичных случаях заболевание проходит через 10 и более дней, а полное выздоровление длится в течение месяца. У детей, пожилых людей и людей с хроническими заболеваниями грипп может вызвать осложнения в легких, головном мозге и сердечной мышце. При тяжелых высокотоксичных (гипертоксических) случаях гриппа могут возникать кровотечения, нарушения функций головного мозга, сердца и внутренних органов, приводящие к летальному исходу. Основные клинические признаки заболевания представлены на рис. (рис. 22).

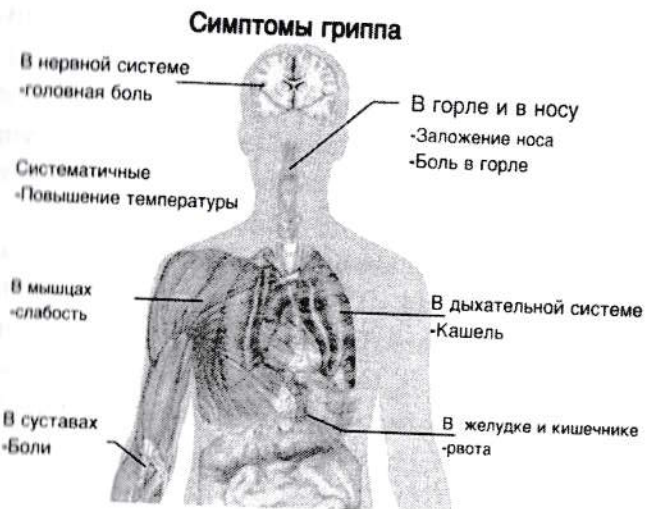


Рисунок 22. Основные симптомы гриппа

Как упоминалось выше, вирус обычно передается через частицы слюны, которые выделяются в воздух, когда больной человек кашляет или чихает. При этом у больного отмечается высокая температура и головная боль. В частности, появляется боль вокруг глазного яблока, вздрагивает тело, больной становится беспомощным, кашляет. Появляются симптомы гриппа, иногда голос больного несколько приглушен, аппетит снижен, рот не в состоянии различать вкус. Наличие лейкопении в крови – постоянный симптом гриппа. По мере ослабления иммунной системы больного активизируется нормальная и условно-патогенная микрофлора в организме, что приводит к ряду дополнительных инфекций. Часто могут возникать бронхит, синусит, пневмония и другие инфекции.

Грипп — это заболевание, которое распространилось в прошлом и до сих пор представляет собой крупную эпидемию, иногда переходящую в пандемию. Также в списке 2019 г. Зарегистрированный коронавирус также вызвал пандемию, которая заразила более 176 тысяч человек во всем мире и унесла жизни более 6000 человек. Поэтому постоянное

изучение таких болезнетворных вирусов является одним из общегосударственных исследований.

Ход работы:

1. Заболевание человека и животных. На основе рисунков и таблиц изучено строение одного из самых распространенных простых и сложных вирусов.

2. Дается четкая информация о вызываемых ими заболеваниях и их симптомах.

3. Распространение вируса изучаются на основе литературы и источников.

4. Структура вириона нарисована в рабочей тетради.



Контрольные вопросы:

1. Как вы понимаете вирусы?

2. Какие опасные заболевания вызывают вирусы у людей и животных?

3. Какие типы гриппа выявлены на сегодняшний день и чем они отличаются друг от друга?

4. Опасные вирусные заболевания для человека, кроме гриппа вы знаете?

5. Какова природа вирусов?

6. Что вы думаете о естественной циркуляции вирусов?

7. Что такое мутация вирусов и её значение?

8. Что вы знаете о полезности вирусов?

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вахобов А.Х., Расулова Т.Х., Низаметдинова Я.Ф., Мансурова М.И., Музафарова И.А. Учебник для практических и лабораторных занятий по микробиологии (латиница). Т.: Издательство «Университет», 2009. - 76 с.

2. Джураева У. М., Магбулова Н. А. Пособие для лабораторных занятий по микробиологии. Ташкент, 2017. 45 с.

3. Джон В. Фостер, Джоан Л. Слончевски. Микробиология: развивающаяся наука США, 2012 г., WW Norton & Co, английский язык, 2011 г.С. 345.

4. Борисов Л.Б. Руководство к лабораторным исследованиям по микробиологии. М. Медицина, 1984. - 234 с.

5. Воробьева А.А. и Кривошеина Ю.С. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии. — М.: Мастерство, 2001. — 148 с.

6. Гусев М.В., Л.А. Минеева. Микробиология: учебник для вузов. - Москва, 2004. - 345 с.

7. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. М.: АСАДЕМА. 2008 г.

8. Громов Б. Строение бактерий. Учеб. Пособие. - Л.: Из-во универ, 1985. - 192 с.

9. Дикий И.Л., Сидорчук И.И., Холупяк И.Ю. и др. Микробиология: Руководство к лабораторной работе: Учеб. пособие для студентов высш.учеб.заведений. Х.: Изд-во НФаУ: Золотые страницы, 2002. - 165 с.

10. Емцев В.Т., Мишустин Е.Н. Микробиология. М.: ДРОФА. 2006. - 324 с.

11. Звягинцев Д.Г., Бабева И.П., Зенов Г.М. Биологическая почва: Учебник. - 3-е изд., испр. и доп. — М.: Изд-во МГУ, 2005. — 445 с.

12. Иногимова М., Вахобов А.Х. Основы микробиологии и вирусологии. Т.: Издательство «Университет», 2010. 224 с.

13. Калганова, Т. Н. Практикум по микробиологии и биотехнологии: лабораторная работа. - Южно-Саксалинск: СаксГУ, 2011. - 56 с.

14. Нетрусова А.И. Практикум по микробиологии. — М.: Академия, — 2005. — 167 с.

15. Расулова Т.Х., Магбулова Н.А. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Ташкент, 2014. - 56 с.

16. Расулова Т.Х., Давранов К.Д., Джураева У.М., Магбулова Н.А. Методическое пособие по микробиологическим исследованиям. Ташкент, 2012. 45 с.

17. Теплер Э.З. Практикум по микробиологии. М.: Дрофа, 2004. 234 с.

18. Ксолт Дж. Краткое описание бактерии Берги. М.: «Мир», 1980. — 187 с.

Сайты:

<http://www.cspi.uz>

<http://www.ziyo.net>

www.nature.uz

www.pedagog.uz

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Питательные среды для роста хемоорганогетеротрофных бактерий

Мясной пептонный бульон (г): 1 л мясного бульона; пептон - 5-10; NaCl - 5; pH 6,8-7,0.

Питательная среда (г): пептон - 10,0; экстракт дрожжи - 1,0; глюкоза — 1,0—4,0; вода дистиллированная - 1000 мл; pH - 6,8-7,0.

Крахмально-аммиачная среда (г): растворимый крахмал — 10,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 2,0; K_2PNO_4 — 1, 0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,0; NaCl - 1,0; CaCO_3 - 3,0; агар - 15; вода - 1000 мл.

Среда Чапека (г): сахароза - 30,0 или глюкоза - 20,0; NaNO_3 - 2,0; K_2FO_4 - 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; KCl - 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; вода дистиллированная - 1000 мл.

Среда БСА (бульон — сусло — агар). ГПБ и сусло 6°Б смешивают в равных объемах и добавляют 2 г/л агара.

Витамины и 1,0 или 0,5 атм стерилизуют в зависимости от того или иного термолабильного фактора.

Питательные среды для сахаролитических клостридий

Картофельная среда с мелом (г): глюкоза - 10,0; пептон - 10,0; K_2FO_4 - 1,0; SaSO_3 — 3,0—5,0; вода - 1000 мл.

Питательные среды для молочнокислых бактерий.

Среда MRS (г): гидролизат казеина - 10,0; мясной экстракт - 10,0; экстракт дрожжи - 5,0; глюкоза - 20,0; ацетат натрия - 5,0; цитрат аммония (двузамещенный) - 2,0; твин-80 - 1,0; K_2FO_4 - 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,05; вода дистиллированная - 1000 мл.

Сапрофит - питательная среда для микобактерий и нокардий

Овсяная мука (ИСП - 3) (г): овсяная мука (или хлопья) - 20,0; агар - 3,0 г.

Питательные среды для актиномицетов

Овсяная мука (ИСП - 3) (г): овсяная мука (или хлопья) - 20,0; агар — 20,0—25,0; вода дистиллированная - 1000 мл; соли - FeSO_4 - 0,1; MnCl_3 - 0,1; ZnSO_4 - 0,1. Водопроводную воду можно использовать вместо дистиллированной воды и солей.

Питательная среда для синтетических и полусинтетических актиномицетов.

Марлевая среда № 2 (г): триптон - 2,5 или бульон Хоттингера - 30 мл; пептон - 5,0; NaCl — 5,0; глюкоза - 10,0; вода - 1000 мл; pH — 7,0—7,4.

Питательная среда для бактерий, разлагающих целлюлозу среда Хатчинсона и Клейтона (г) для аэробных бактерий, целлюлоза - кусочки фильтровальной бумаги; NaNO_3 - 2,5; K_2HPO_4 - 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3; NaCl - 0,1; $\text{CaC}_{12} \times 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,01; вода дистиллированная - 1000 мл.

Среда Имшенецкого для анаэробных бактерий (г): бумага фильтровальная - 15,0; $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$ - 1,5; K_2HPO_4 - 0,5; KH_2PO_4 - 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,4; NaCl - 0,1; пептон - 5,0; $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; FeSO_4 - 0,1; CaSO_3 - 2,0; вода дистиллированная - 1000 мл; pH 7,0—7,4.

Питательная среда для азотфиксаторов

Среда Ашби (г): сахароза или маннит - 20,0; K_2HPO_4 - 0,2; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; NaCl - 0,2; FeSO_4 - 0,1; CaSO_3 - 5,0; вода дистиллированная - 1000 мл. Среда Виноградского (г) для бактерий рода *Clostridium*, анаэробный азотфиксатор: глюкоза - 20,0; K_2HPO_4 - 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; CaSO_3 - 20,0; NaCl , MnSO_4 , FeSO_4 — 0,1; вода дистиллированная - 1000 мл.

Калининская модификация среды Федорова для выделения азотфиксаторов (г): глюкоза - 10,0-15,0; K_2HPO_4 - 1,74; KH_2PO_4 — 0,91; $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ - 0,3; $\text{CaC}_{12} \times 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; NaCl - 0,5; $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,01; экстракт дрожжи - 0,015; микроэлементы Федорова - 1 мл; вода дистиллированная - 1000 мл.

Бобовый агар для кишечных бактерий (г): отвар фасоли - 1000 мл; сахароза - 2,0; KH_2PO_4 - 1,0; $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ — 0,3; агар - 15; pH 7,0-7,2.

Маннитол-капельная среда для кишечных бактерий (г): маннит - 10,0; экстракт дрожжи - 1,0; K_2HPO_4 - 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; NaCl — 0,1—0,2; $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ - 0,002; агар - 15,0; вода дистиллированная - 1000 мл; pH 6,8-7,0.

Питательная среда для дрожжей

Среда Сабуро (г): глюкоза - 40; пептон - 10; агар - 20; вода - 1000 мл.

Глюкозно-аммиачная среда (г): глюкоза - 20,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 5,0; KH_2PO_4 - 0,85; K_2HPO_4 - 0,15; $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ - 0,5; NaCl - 0,1; $\text{CaC}_{12} \times 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; вода дистиллированная - 1000 мл.

Отдельно стерилизуют и добавляют в среду перед посевом.

В последние 2 среды иногда добавляют дрожжевой или мясной экстракт для обогащения их факторами роста в количестве 2-5 г на 1 л среды.

РЕЦЕПТЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАСТВОРОВ, ИНДИКАТОРОВ И ОКРАСКИ

Фуксин представляет собой основной насыщенный спиртовой раствор. Основа фуксина - 10 г; этанол - 96% - 100 мл.

Фуксин основной карболовый (Tuber fuchsia)

5% водный раствор свежеприготовленного фенола - 100 мл; насыщенный, спиртовой раствор основного пурпурного - 10 мл. Приготовленную смесь фильтруют через 48 часов. Отличается устойчивостью краски.

Основной фуксин, водный раствор

Цил карболовый фуксин — 1 мл; вода дистиллированная - 9 мл. Водный раствор фуксина готовят непосредственно перед началом работы, так как он нестабилен.

Метиловый синий, насыщенный раствор

Метиловый синий — 3 г; Этанол 90% - 100 мл. Раствор хранят 2-3 дня, несколько раз перемешивают, затем фильтруют. Решение стабильно.

Метиловый синий 1:40

спиртовой раствор метилового синего - 1 мл; дистилляция. вода - 40 мл.

Метиловый синий (по Леффлеру)

Спиртовой раствор метилового синего - 30 мл; дистилляция. вода - 100 мл; КОН, 1% водный раствор - 1 мл.

Фиолетовая карболовая горечавка

Решение 1. горечавка пурпурная - 1 г; этанол 96% ли — 10 мл. 2 решение. 5% водный раствор свежееоткачанного фенола - 100 мл. Как только раствор горечавки пурпурной полностью растворится, растворы перемешивают.

Кристаллический пурпурный, водный раствор

кристаллический пурпурный - 20 мг; дистилл. вода - 100 мл.

Карболовый эритрозин

Эритрозин - 3 г; вода дистиллированная - 100 мл; свежеперегнаный фенол - 5 г. Когда эритрозин и фенол полностью растворяются, соединения осаждаются.

Шафран, водный раствор

2,5 % раствор шафрана в 96 % этиловом спирте — 1,0 мл; дистилл. сув - 100 мл.

Реагенты для окрашивания ульев

Протрава. 12 г танина нагревают и растворяют в 48 мл дистиллированной воды, к раствору прибавляют 30 мл ненасыщенного водного раствора сульфата железа (FeSCu) и 6 мл насыщенного спиртового раствора фуксина. Раствор фильтруют и хранят в банке с плотно закрытой крышкой. Протрава готова через несколько дней после приготовления и может храниться несколько месяцев.

Краситель - карболовая фуксия туберкулеза в соотношении 1:1 и дистиллированная вода.

Заранее готовят карболовую фуксию Протрав и Циля. Разбавленную фуксию готовят перед употреблением. Перед началом работы необходимо протраву и разведенную фуксию пропустить через складчатый бумажный фильтр, т. к. осадки красителей, образующиеся при скоплении небольшого количества белка на стенке емкости, в которой хранятся красители, могут препятствовать слизыванию..

Реагенты для окрашивания хивчинов фонтанным методом

Протрава: дубильные вещества - 5 г; фенол кристаллический - 1 г; дистилл. вода - 100 мл.

Реактивы для серебрения: серебро с азотом - 5 г; дистилл. сув - 100 мл.

Раствор серебра следует готовить без фильтрации и хранить в темном месте. К 3-4 мл 5%-ного раствора кислого азотистого серебра прибавляют по каплям раствор аммиака до помутнения раствора и образования осадка, а затем осторожно

до растворения осадка. Затем его снова добавляют из раствора серебра до образования легкой опалесценции. Полученный раствор аммиачного серебра перегоняют, разводят водой в 10 раз.

Черный анилин.

Анилин черный — 1,5 г; этанол 96% - 50 мл; 80% уксусная кислота — 10 мл; дистилл.сув - 40 мл. После растворения веществ краситель фильтруют и его можно использовать через 3 дня.

Красители для обнаружения липидов:

Судан III - 0,5 г; концентрированная молочная кислота - 100 мл.

Черный Судан V - 0,3 г; Спирт этиловый 70% горячий — 100 мл. Раствор выдерживают в закрытой посуде при температуре +60°C в течение нескольких часов, затем охлаждают и фильтруют.

Зеленый малахит, водный раствор

Зеленый малахит - 7,5 г; дистилл.сув - 100 мл.

Раствор Люголя в модификации по Грамму

йод кристаллический - 1 г; йодистый калий - 2 г; дистилл.сув - 300 мл.

В колбу вместимостью 30-50 мл добавляют йод и йодистый калий, смесь смешивают с пестицидом, добавляют 1 мл дистиллированной воды и снова хорошо перемешивают кристаллы, добавляют еще 5 мл дистиллированной воды. Йод Калий растворим в йоде. Раствор переливают в стеклянную банку и добавляют воду до достижения объема 300 мл. Раствор можно хранить в черной емкости в течение 30 дней.

Раствор для определения гликогена и гранул

йод кристаллический — 1 г; йодистый калий - 3 г; вода дистиллированная - 300 мл. Раствор готовят, как и раньше.

Подготовка сна к негативному контрасту

Черный сон - 10 мл; вода дистиллированная - 30 мл.

Разведенный сон центрифугируют, в пробирки добавляют поверхностную жидкость и стерилизуют при 0,5 атм. Его можно хранить, добавляя по 1 капле раствора тимерсола в соотношении 1:2 (1:1000) и твин-80 (1:100) - 100 мл.

Фиксирующие жидкости

96% этиловый спирт; время фиксации - 10-15 мин.

Метиловый спирт безводный; время фиксации — 3-5 мин.

смесь Никифорова; равные количества этилового спирта и сернистого эфира, время фиксации - 5-10 мин.

Спиртформол - 40% формалин - 5 мл; 96% этиловый спирт - 95 мл; время фиксации - 5-15 мин.

Водный раствор осмиевой кислоты 1-2%; Занавес фиксируется на 3-5 минут. Раствор осмиевой кислоты хранят в темной посуде с плотной пробкой. Следует соблюдать осторожность во время работы, так как взятки осмия могут повредить глаза.

40% формалин, парад фиксируется на несколько секунд.

Фиксатор Carnua: спирт 96% - 60 мл, хлороформ - 30 мл, конц. (ледяная) уксусная кислота - 10 мл; время фиксации — 15 мин.

Руж жидкий: 40% формалин - 20 мл, конц. уксусная кислота - 1 мл, дистиллированная. вода - 1000 мл; время фиксации - 5 мин. Рекомендуется использовать при фиксации клеток, выращенных в жидкой среде неопределенного состава.

Фосфорномолибденовая кислота, 5% водный раствор; время фиксации - 5 мин.

Физиологическое решение

Готовят 0,85% раствор NaCl на дистиллированной воде. При необходимости стерилизуют 1 атм в течение 30 мин.

Производство изделий и покрытий для изготовления лекарственных средств.

Поверхность изделия и окон крышки считается чистой в случае стекания капель воды по всей поверхности. Свежие

стаканы обычно кипятят в 1% растворе соды, затем промывают в дистиллированной воде, затем промывают слабым раствором соляной кислоты и снова дистиллированной водой. Использованные стаканы кипятят в мыльном растворе, затем замачивают в смеси хрома на 1 сутки. Для промывки бихромата его несколько раз промывают водопроводной водой, затем дистиллированной водой. Чистые промытые стеклянные крышки хранят в 96° этиловом спирте в плотно закрытой таре.

Обработка инструментальных окон по Ситнову.

Стаканы кипятят 10 минут в следующем растворе: бихромат калия — 20 г; дистилл.сув - 200 мл; концентрированная серная кислота - 20 мл.

Промыть слабым раствором щелочи натрия в течение 5 минут. Тщательно промыть водой, затем промыть спиртом.

При отсутствии предварительно подготовленных обезжиренных стекол подготавливают окна, протирая их насухо хозяйственным мылом и затем протирая чистой хлопчатобумажной тканью.

Средство для мытья посуды

Хромовый сплав. 1. К концентрированной серной кислоте добавляют около 5% порошка кристаллической двуххромовой кислоты калия ($K_2Cr_2O_7$) и осторожно нагревают в фарфоровой посуде до растворения на водяной бане.

Дихромон калия растворяют в воде, затем к раствору осторожно добавляют серную кислоту. Смесь готовят следующим образом: вода - 100 мл; дихром калия - 6 г; серная кислота - 100 мл.

После многократного использования темно-желтый цвет хромовой смеси становится темно-зеленым. Такая смесь не обладает моющими свойствами, не пригодна для мытья посуды, загрязненной парафином, парафином, минеральными

маслами и другими продуктами нефтепереработки с примесью хрома.

Соединение хрома разрушает ткани животного и растительного происхождения, поэтому в таких случаях нужно соблюдать большую осторожность. Когда смесь хрома вступает в контакт с руками или одеждой, это место следует немедленно тщательно промыть большим количеством воды, а затем тщательно промыть разбавленным раствором аммиака, соды или большим количеством воды.

Материалы и инструменты:

Автоклав.

60 °С с термостатом.

Сушильный шкаф с сухим воздухом.

Светополный микроскоп, лампы для освещения.

Фазово-контрастный микроскоп.

Камерный микроскоп

Ламинарный бокс.

Холодильник.

Аппарат для кипячения и заливки сред.

Микропипетки (разных размеров).

Вибратор с регулируемой температурой, водяная баня, теххимические весы и камни.

Микроволновая печь для размораживания сред.

Дистиллятор.

Стекланные инстрименты, специальная встраиваемая стеклянная посуда, покровное стекло, стеклянные стержни.

Спирты, препаровальные иглы, стерильные пипетки, чашки Петри, химические чашки, стеклорезы, кристаллизаторы стеклянные, стерильные растворы, колбы 50, 100, 200, 400, 500, 1000 мл.

Бензин, дистиллированная вода, фильтровальная бумага, марля,

Растворы гороха, сена, навоза, дрожжей.

Красители: основной фуксин, метиловый синий, раствор люголя, генцианвиолет, черный сон, судан-3, концентрированный раствор йода, 40% и 1% растворы формалина, 1 н р-р НСл, 5% р-р хромовой кислоты, 1% р-р N_2SO_4 , карболовый фуксин.

19. Среда: Полусинтетика ГПА, ПА, ЭНДО, МПБ, ПБ, агар Эшби, Эшби, Гетченсона, Виноградского, Рашмана, Гилтая.

Глоссарий

Агар(агар-агар)	Продукт, полученный из морских водорослей (полисахарид), используемый для приготовления твердой питательной среды.
Адьювант	вспомогательное вещество, усиливающее иммунный ответ.
Агглютинация	связывание клеток (микроорганизмов, эритроцитов, лейкоцитов и др.) со специфическими антителами в присутствии электролитов.
Приспособление	гибкая реакция на изменения внешней среды, проявляющаяся изменением симптомов или свойств микроорганизмов.
Аллергены	вещества антигенной природы (полные антигены или гаптены), вызывающие реакцию гиперчувствительности (аллергию).
аллергия	форма иммунного ответа, возникающая в результате накопления иммуноглобулинов или Т-лимфоцитов в результате обратной связи с аллергенами.
Аммонификация	Азот — одна из стадий круговорота азота в природе, протекающая с выделением аммиака и его солей ферментами микроорганизмов в результате распада остаточных веществ (белков) живых организмов.
Анатоксины	токсины микроорганизмов, нейтрализуют формалином (при

	температуре 37-40°C в течение 3-4 недель), для активной иммунопрофилактики используют микробные токсины, сохраняющие антигенность и иммуногенность.
Анафилаксия	специфические антитела – острый вид аллергии, вызываемый реагентами (иммуноглобулины класса E).
Анаэробы	микроорганизмы, получающие энергию в результате разложения питательных веществ в присутствии свободного молекулярного кислорода воздуха.
Анаэроостат	устройство для выращивания анаэробных микроорганизмов.
Энергия	отсутствие существующего иммунного ответа на антиген.
Антибиотики	химические лечебные вещества природного, полусинтетического или синтетического происхождения, препятствующие росту и размножению микроорганизмов или приводящие к их гибели.
Антигены	представляют собой чужеродные генетические вещества, которые приводят к развитию иммунного ответа, а также выработке антител.
Антисептики	бороться с инфекцией различными способами.
Антитана	Глобулин – сывороточный белок, вырабатываемый клетками иммунной системы организма в ответ на действие антигена.

Антитоксины	антитела, вырабатываемые против микробных токсинов.
Апоптоз	запрограммированный биологический механизм гибели клеток.
Асептика	система профилактических мероприятий, направленных на предотвращение попадания микробов в органы и ткани больного при проведении медицинских манипуляций.
Ауксотрофный	бактерия, утратившая способность синтезировать какой-либо фермент и требующая введения в питательную среду определенных веществ, которые она не может синтезировать самостоятельно.
Автовакцина	антигенный препарат, используемый для лечения, приготовленный из штаммов микроорганизмов, выделенных из организма больного.
Автозаражение	инфекция, специфическая для больного микрофлора, вызывающая заболевание.
Автотроф	бактерия, использующая естественные неорганические вещества (атмосферный углекислый газ, молекулярный азот, соли аммония, нитраты, нитриты и др.) в качестве источника углерода и азота для построения в своей клетке органических соединений.
Близость	прочность связи между антигеном и антителом.
аэробы	микроорганизмы, получающие энергию с помощью свободного молекулярного кислорода воздуха.

бактериемия	наличие микроорганизмов в крови.
Бактериальный носитель	организм, в котором обнаруживаются болезнетворные микробы на фоне клинических проявлений инфекции и отсутствия патологических изменений в органах и тканях.
Бактериофаг	бактериальный вирус.
Бактерицидный эффект	тип воздействия различных факторов, приводящих к гибели микроорганизмов
вакцинация	процесс отправки вакцины для создания искусственного активного иммунитета.
Вид	таксономическая категория в систематике микроорганизмов
Вироид	инфекционные агенты, состоящие из белковой оболочки и молекулы РНК.
Вирулентность	степень, мера бактериальной патогенности. Количественное выражение вирулентности: ОМД - минимальная летальная доза, ЛД50 - летальная 50%.
Гаптан	неполный антиген, который не приводит к образованию антител, но реагирует с готовыми антителами.
Гемагглютинация	адгезия эритроцитов. Прямые (несерологические) реакции при взаимодействии эритроцитов с некоторыми микроорганизмами (в том числе вирусами), а также не прямые (при взаимодействии эритроцитов) пассивные) серологические реакции, при которых на поверхность адсорбируются антитела или антигены, соответственно, содержащие антигены или молекулы

	антител.
гемокультура	культуры микроорганизмов, выделенных из крови.
Гемолит	разрушение эритроцитов (лизис).
Генерал	наименьший фрагмент ДНК (наследственная единица), позволяющий передавать признаки из поколения в поколение.
Геном	сумма всех генов в клетке.
Генетическая рекомбинация	(трансформация, транскрипция, конъюгация) - это процесс образования нового генома из слияния генетического материала двух организмов.
гетеротрофы	виды бактерий, которые используют органические соединения в качестве источника углерода или азота.
Гиперчувствительность	повышенная чувствительность к антигенам (аллергенам).
Дезинфекция	уничтожение патогенных микроорганизмов в объектах внешней среды различными методами.
Дисбактериоз	состояние, обусловленное изменением количества и качества биотопы микроорганизма, входящего в состав нормальной микрофлоры.
Иммунитет	Механизм защиты многоклеточного организма от генетически чужеродных агентов.
Иммунный комплекс	комплексы антиген-антитело.
инвазивность	патогенный фактор, обеспечивающий поступление и распространение в организме патогенных микроорганизмов.

Интерлейкин	группа цитокинов.
Интерфероны	цитокины, обеспечивающие внутриклеточную защиту организма. Важнейшая система противовирусной защиты.
Источник инфекции	источник возбудителя болезни (зараженный человек, животное или растение).
Клон	поколение образовалось из одной клетки.
комменсализм	форма сосуществования микроорганизмов, при которой один вид использует другой, не нанося вреда другому.
Лисогенез	добавление нуклеиновой кислоты бактериофага к бактериальному геному.
лизосома	органойды эукариотических клеток, выполняющие внутриклеточные пищеварительные функции. Активно участвует в процессе фагоцитоза.
лизоцим	фермент, вызывающий расщепление пептидогликанов в клеточной стенке.
Липополисахариды	вещества, образующие наружную мембрану грамположительных бактерий. Обладают высокой токсичностью (за счет липида А) и антигенными свойствами (О-антиген).
L-образные бактерии	бактерии, частично или полностью лишенные клеточной стенки в результате воздействия определенных факторов (антибиотиков, антител, солей и др.).
Мезосома	энергосберегающая органоидная

	структура прокариот, образующаяся в результате инвагинации цитоплазматической мембраны в цитоплазму. Участвуют в обменных процессах в клетках.
Мезофильные микроорганизмы	микроорганизмов с оптимальной скоростью роста 35-37° С.
Метобиоз	тип взаимоотношений между микроорганизмами, создающий благоприятные условия для жизни одного вида другому виду (аэробы - анаэробы).
Метаболизм микроорганизмов	микробный метаболизм.
Микоз	заболевания, вызванные патогенными грибами.
Микоплазма	Грамнегативные микроорганизмы, не имеющие твердой клеточной стенки.
микроаэрофилы	микроорганизмы, которым требуется небольшое количество молекулярного кислорода.
микрофлора	микробные сообщества (биотопы), обитающие в органах и тканях организма.
Мицелий	Грибы представляют собой клеточные нити.
Мутагены	физические, химические или биологические факторы, вызывающие мутации микроорганизмов.
Мутант	Микроорганизм, характеристики которого отличаются от родительского в результате мутаций.
N-антиген	белкоподобный антиген бактерий.

Нитрификация	процесс окисления аммиака до нитритов и нитратов в аэробных условиях.
О-антиген	соматический антиген бактерии, локализованный в клеточной стенке, цитоплазме и мембранах.
Оппортунистические микробы	условно-патогенные микроорганизмы.
Паразитизм	специфическая форма взаимоотношений, при которой один микроорганизм (паразит) живет за счет другого и повреждает его.
Пастеризация	один из методов стерилизации.
Патогенность	способность микроорганизма вызывать инфекционный процесс.
Пили	Наружная органелла, состоящая из белка кокона, используемая клеткой микроорганизма для прикрепления к другой клетке или субстрату и для обмена половым материалом.
Плазма	фрагмент ДНК микроорганизма, который может воспроизводиться автономно.
Прионы	Инфекционные вещества белковой природы, возбудитель некоторых медленных инфекций.
Прототрофы	микроорганизмы, способные самостоятельно синтезировать все необходимые органические соединения.
Профаг	нуклеиновая кислота мертвого фага, связанная с хромосомой бактериальной клетки.
Психрофильные микроорганизмы	Оптимальная температура роста 10-15°C микрорганизмы.

Реактогенность	природа вакцинных штаммов, вызывающих вакцинные реакции и поствакцинальные осложнения.
Ревакцинация	повторное введение вакцины.
Ремиссия	Латентная стадия инфекционного заболевания в организме.
Рецессивный	возвращение симптомов болезни после ремиссии.
Сапрофиты	микроорганизмы, питающиеся мертвой органикой.
саттелитизм	тип взаимодействия между разными видами микроорганизмов, которые живут вместе, не причиняя друг другу вреда. В этом случае микробные спутники находятся ближе к хозяину и улучшают их рост.
Симбиоз	уникальные отношения, в которых члены команды получают выгоду друг от друга.
Синергизм	усиление физиологических функций различных видов микроорганизмов, присутствующих в микробном сообществе.
Стерилизация	процесс полного уничтожения вегетативных и споровых форм микроорганизмов.
Суперинфекция	рецидив больного на фоне неизлечимой инфекции одноклеточным возбудителем.
Иммуные сыворотки	препараты, образующиеся в результате гипериммунизации животных разными антигенами и получаемые из сыворотки крови.
Сывороточная	форма аллергической реакции.

болезнь	
Такси	направленное действие бактерий под влиянием некоторых веществ.
Термостат	аппарат, используемый для выращивания микроорганизмов, поддерживающих определенную постоянную температуру.
Термофильные микроорганизмы	бактерии с оптимальной температурой роста 45°C и выше.
Тиндализаты	метод щадящей стерилизации среды, содержащей белки.
Токсемия	наличие микробных токсинов в крови.
токсигенность	способность микроорганизмов продуцировать экзотоксины.
Иммунологическая толерантность	состояние реактивности к определенным антигенам (отсутствие реакции иммунной системы).
Тропизм	избирательное свойство патогенных микроорганизмов колонизировать и заражать определенные организмы, органы или ткани.
Фаговое преобразование	изменение свойств микроорганизмов в результате лизогенизации клетки с помощью профилактики.
Фагоцитоз	процесс адсорбции, захвата, поглощения и уничтожения чужеродных агентов эукариотической клеткой.
Фитопатогенные микробы	виды микроорганизмов, вызывающие инфекционные заболевания растений.
Хроническая инфекция	длительное инфекционное заболевание.
Цитокины	белковые молекулы, участвующие в регуляции межклеточных коммуникаций

	при иммунных реакциях.
Чистая культура	культура, образованная из определенного вида микроба.
Экзотоксины	белковое вещество, вырабатываемое микроорганизмами и выделяемое в окружающую среду.
Эндотоксины	липополисахаридное токсическое вещество (ЛПС) грамотрицательных микроорганизмов, выделяющееся после гибели и разрушения клеток.
Эпитоп	связанный активный сайт антигена или сайт антигена, взаимодействующий с Т-клеточными рецепторами.
Эпифиты	микроорганизмы, постоянно обитающие в надводных частях растения.
Эубиоз	сумма микроорганизмов (микробиоценозов), обитающих в биотопах здорового организма человека.

ОГЛАВЛЕНИЕ:

Введение	3
Часть 1. Общая характеристика микроорганизмов	5
1.1. Прокариоты	5
1.2. Эукариоты	7
1.3. Распространение микроорганизмов во внешней среде и влияние на них факторов внешней среды	8
Часть 2. Лаборатория микробиологии и правила работы в ней...	10
1-лаб. занятие: Правила работы с микроорганизмами	10
2-лаб. занятие: Оборудование, необходимое для микробиологических исследований	15
3-лаб. занятие: Ознакомление с питательными средами и методами стерилизации	22
4-лаб. занятие: Изучение строения микроскопа МБР-1	31
5-лаб. занятие: Приготовление живых препаратов микроорганизмов и микроскопические наблюдения	42
6-лаб. занятие: Приготовление фиксированного окрашенного препарата	44
7-лаб. занятие: Приготовление элективной культуры сенных бацилл и наблюдение под микроскопом	50
8-лаб. занятие: Изучение морфологического строения палочковидных бактерий	53
9-лаб. занятие: Изучение морфологического строения шаровидных бактерий	56
10-лаб. занятие: Изучение водной микрофлоры	60

11-лаб. занятие: Изучение микрофлоры воздуха	65
12-лаб. занятие: Микроорганизмы. Идентификация по Граму	70
13-лаб. занятие: Изучение почвенных микроорганизмов	73
14-лаб. занятие: Приготовление питательной среды для роста микроорганизмов	80
15-лаб. занятие: Приготовление плотной питательной среды для роста микроорганизмов	85
16-лаб. занятие: Изучение процесса спиртового брожения и участвующих в нем микроорганизмов	88
17-лаб. занятие: Молочная кислота – живой стимулятор процесса брожения. Идентификация организмов	91
18-лаб. занятие: Выявление микроорганизмов, вызывающих жирнокислотное брожение	94
19-лаб. занятие: Выявление живых организмов, вызывающих ферментацию целлюлозы	98
20-лаб. занятие: Выявление микроорганизмов, вызывающих уксуснокислое брожение	102
21-лаб. занятие: Получение элективной культуры анаэробных микроорганизмов, усваивающих молекулярный азот	105
22-лаб. занятие: Приготовление элективной культуры аэробных азотфиксирующих микроорганизмов	108
23-лаб. занятие: Выявление почвенных азотфиксирующих микроорганизмов	110

24-лаб. занятие: Изучение азотфиксирующих микроорганизмов, живущих в симбиозе	112
25-лаб. занятие: Обнаружение бактерий, вызывающих нитрификацию	114
26-лаб. занятие: Приготовление питательной среды для выделения денитрифицирующих микроорганизмов	117
27-лаб. занятие: Изучение элективной культуры денитрифицирующих микроорганизмов методом микроскопии	119
28-лаб. занятие: Изучение вирусов у человека и животных на основе таблиц и рисунков.	122
Список использованной литературы	127
Приложения	129
Питательные среды для роста микроорганизмов	129
Краски, индикаторы и растворы	129
Материалы и инструменты	135
Глоссарий	139

З.Ш.СОБИРОВА, Т.А.АЛЁХИНА, В.Б. ФАЙЗИЕВ

ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЗАНЯТИЙ

Редактор:	Х. Тахиров
Технич. редактор:	С. Меликузиева
Корректор:	М. Юнусова
Верстальщик:	А. Зиямухамедов

Лицензия издательства № 2044, 25.08.2020 й.

Формат 60x84 1/16. Гарнитура "Cambria" 16 кегль.

Напечатано офсетным способом. Условная печатная форма 10.

Кол-во 100 шт. Заказ № 2664552.

Напечатано в ООО Ilm nurli kitob.

Тел. номер 94 673 66 56

ДЛЯ ЗАМЕТОК

This image shows a single sheet of white paper with horizontal blue or grey ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are approximately 20 lines visible. The paper appears to be a standard notebook page.

ДЛЯ ЗАМЕТОК

This image shows a single sheet of white paper with horizontal blue or grey ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There is no handwriting or other markings on the paper.



ISBN 978-9911-264-78-7



9 789911 264787