

ПЕРМСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ

# МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

Рабочая тетрадь  
для лабораторно-практических занятий



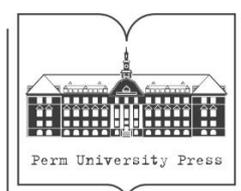
МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

# МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

**Рабочая тетрадь для лабораторно-практических занятий**

*Допущено методическим советом  
Пермского государственного национального  
исследовательского университета в качестве  
учебно-методического пособия для студентов,  
обучающихся по направлениям подготовки бакалавров  
«Биология», «Биотехнология»,  
а также по специальности «Фармация»*



Пермь 2024

УДК 579.24: 578

ББК 28.3+28.4

M597

**Микробиология** и вирусология. Рабочая тетрадь для лабораторно-практических занятий [Электронный ресурс] : учебно-методическое пособие / сост. А. А. Елькин, В. Ю. Ушаков, Л. Ю. Нестерова ; Пермский государственный национальный исследовательский университет. – Электронные данные. – Пермь, 2024. – 1,38 Мб ; 90 с. – Режим доступа: <http://www.psu.ru/files/docs/science/books/uchebnie-posobiya/mikrobiologiya-i-virusologiya-rabochaya-tetrad.pdf>. – Заглавие с экрана.

ISBN 978-5-7944-4149-9

В пособии содержатся краткие сведения об объектах микробиологии, описание основных методов и приемов работы с микроорганизмами, а также излагаются методы микроскопического анализа, принципы составления питательных сред и условий культивирования микроорганизмов и способов стерилизации. Практикум составлен в виде серии лабораторных задач с сопутствующей теоретической частью, предлагаемых студентам для аудиторной и самостоятельной работы.

Цель издания – помочь студентам в приобретении навыков лабораторной работы с микроорганизмами.

Предназначен для студентов бакалавриата, обучающихся по направлениям 06.03.01 Биология, и для студентов специалитета по специальности 33.05.01, Фармация в качестве пособия по дисциплине «Микробиология и вирусология».

**УДК 579.24:578**

**ББК 28.3+28.4**

*Издается по решению ученого совета биологического факультета  
Пермского государственного национального исследовательского университета*

*Рецензенты:* кафедра микробиологии и вирусологии Пермского государственного медицинского университета им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России (зав. кафедрой – д-р мед. наук, профессор **Э. С. Горовиц**);

зав. лабораторией физиологии и генетики микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН) д-р биол. наук, профессор **О. Н. Октябрьский**

© ПГНИУ, 2024

© Елькин А. А., Ушаков В. Ю., Нестерова Л. Ю.,  
составление, 2024

ISBN 978-5-7944-4149-9

## Содержание

Предисловие.....	4
Основные положения техники безопасности.....	6
Занятие 1. Составление сред и методы стерилизации.....	8
Занятие 2. Устройство светопольного микроскопа и правила работы с ним.....	15
Занятие 3. Морфологическое разнообразие бактерий.....	21
Занятие 4. Клеточная стенка бактерий.....	28
Занятие 5. Споры бактерий.....	37
Занятие 6. Бактериальные биопленки.....	46
Занятие 7. Чувствительность бактерий к антибиотикам.....	54
Занятие 8. Получение чистых культур и учет микрофлоры воздуха.....	69
Список рекомендуемой литературы.....	76
Приложение 1. Подготовка микробиологической лаборатории к работе.....	78
Приложение 2. Правила работы с культурами микроорганизмов.....	79
Приложение 3. Правила работы с пипетками (дозаторами) переменного объема.....	80
Приложение 4. Приготовление основных красителей.....	82
Приложение 5. Средства для мытья лабораторной посуды.....	83
Приложение 6. Средства для обработки рабочего стола.....	84
Приложение 7. Обработка предметных стекол.....	84
Приложение 8. Методические инструкции по подготовке исследовательского отчета по лабораторной работе.....	85
Для заметок.....	87

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Практические занятия должны быть тесно связаны с теоретическим курсом микробиологии. В ходе практических занятий студенты закрепляют полученные теоретические знания, осваивают методы микробиологического исследования и правила работы с культурами микроорганизмов. Следует экономно расходовать реактивы и бережно относиться к лабораторному оборудованию. Необходимо соблюдать требования техники безопасности: при выполнении заданий работать в халате, соблюдать тишину, не принимать пищу. Для выполнения лабораторных работ необходимо иметь при себе цветные карандаши и предлагаемую тетрадь для записи. Каждый студент на протяжении всех занятий работает на постоянном месте, с одним и тем же микроскопом, имеющим порядковый номер, и готовит препараты самостоятельно.

В целях правильного понимания основных задач практикума перед каждым занятием даются краткое объяснение общих положений по данной теме и подробное описание методик и приемов проведения наблюдений, которые описаны в соответствующем учебном пособии, сопровождающем теоретический курс.

Индивидуальная работа осуществляется преподавателем с каждым студентом по мере выполнения задания. Преподаватель следит за тем, как студенты выполняют задание, и в случае необходимости оказывает им помощь. Хорошо выполненные препараты рекомендуются для ознакомления всем студентам в качестве примера качественного выполнения работы. Для проверки усвоения студентами пройденного материала и закрепления навыков лабораторной работы проводится семинар, а на последнем практическом занятии им предоставляется возможность провести комплексный микроскопический анализ бактериальных культур, которые выделяются каждым студентом самостоятельно.

Каждое лабораторное занятие с использованием рабочей тетради состоит из трех частей: вводной, практической и заключительной. Введение содержит минимальный уровень теоретических знаний, достаточный для проведения экспериментов, но не освобождающий от изучения обязательной и дополнительной учебной литературы. Практическая часть в себя включает пошаговые инструкции для проведения лабораторных работ, дополненные поясняющими рисунками и схемами. Рабочая тетрадь содержит перечень микробных культур, материалов, химических реагентов и оборудования, необходимых для проведения конкретного лабораторного эксперимента. Особо важным является раздел «Наблюдения и результаты», в котором исполнителем должны быть описаны результаты самостоятельных наблюдений, исполнены лаконичные учебные зарисовки, произведены математические расчеты и созданы сводные таблицы с

исходными данными. Заключение представляет собой часть работы, где необходимо сформулировать обоснованные выводы по результатам проведенных исследований. Каждое практическое занятие сопровождается перечнем контрольных вопросов для самопроверки знаний по теме занятия. Проведение практических занятий способствует приобретению студентами навыков экспериментальной работы и использования лабораторного аналитического оборудования, а также развитию критического мышления и оценочной интерпретации полученной информации.

Для проведения практических занятий лаборант заранее готовит необходимый материал. Приборы, реактивы, инструменты на рабочем столе должны быть расставлены с учетом правил техники безопасности. После каждого занятия следует привести свое рабочее место в порядок, а отработанные препараты обязательно поместить в сосуд с дезинфицирующим раствором.

# **ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ**

## **ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ ПЕРЕД НАЧАЛОМ РАБОТЫ**

1. Перед началом работы студент должен получить от преподавателя конкретное задание и подробное инструктирование об опасных моментах, связанных с работой, а также о необходимых мерах предосторожности во время выполнения работ.

2. Приступая к работе, студент должен заранее подготовить необходимое оборудование, посуду, реактивы, штаммы микроорганизмов.

3. При выполнении любого вида экспериментов необходимо надеть халат.

4. Воспрещается производить работы, не связанные с выполнением полученных заданий без предварительного инструктажа преподавателя, на неисправном оборудовании и без предусмотренных средств защиты.

5. Запрещается работать без специальной или санитарной одежды и предохранительных приспособлений.

## **ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ ВО ВРЕМЯ ПРОВЕДЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ**

Исходя из специфики работы необходимо соблюдать следующие способы и приемы безопасного проведения исследований:

1. Микробиологические исследования проводят на питательных средах с условно-патогенными микроорганизмами в боксовых помещениях лаборатории в чистых халатах.

2. Обязательно ежедневное проведение влажной уборки помещений лаборатории.

3. Насасывание в пипетки растворов химических реактивов и жидкостей, содержащих возбудителей инфекционных заболеваний, производят с помощью резиновой груши или автоматической пипетки, насасывание ртом не допускается.

4. При эксплуатации термостата необходимо соблюдать следующие требования:

- запрещается ставить в термостат легковоспламеняющиеся вещества;
- нельзя снимать предохранительные колпаки от регулирующих устройств без электромонтера;

- производить чистку термостата только после отключения его от сети;
- термостаты дезинфицируются не реже одного раза в месяц.

5. При проведении исследований необходимо соблюдать следующие правила:

- работу с инфекционным материалом проводят с помощью инструментов (пинцеты, иглы, петли), запрещается прикасаться руками к исследуемому материалу;
- посев материала в пробирки и чашки Петри производят вблизи от огня горелки, с обжиганием петли, шпателя, краев пробирок;
- при посеве материала делают надпись на пробирках, чашках, колбах, с указанием названия материала, номера культуры и даты посева или соответствующего регистрационного номера;
- во время работы все чашки с посевами помещают на подносы, а пробирки в штативы;
- перед работой тщательно проверяют целостность стеклянной посуды;
- по окончании работы запрещается оставлять на рабочих столах нефиксированные чашки Петри, пробирки и другую посуду с материалом.

# ЗАНЯТИЕ 1

## СОСТАВЛЕНИЕ СРЕДИ И МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Дата \_\_\_\_\_

### Задачи

1. Изучить правила работы в микробиологической лаборатории.
2. Ознакомиться с рецептурой, техникой приготовления и требованиями, предъявляемыми к основным питательным средам.
3. Овладеть различными методами стерилизации.
4. Подготовить материалы и питательные среды для стерилизации.

### Введение

#### *Классификация сред для бактерий*

По исходным компонентам различают *натуральные* и *синтетические* среды. Натуральные среды готовят из продуктов животного и растительного происхождения. Синтетические среды готовят из определенных химически чистых органических и неорганических соединений (соли, углеводы, аминокислоты, витамины и др.).

По консистенции (степени плотности) среды бывают *жидкие*, *плотные* и *полужидкие*. Плотные и полужидкие среды готовят из жидких, к которым для получения среды нужной консистенции прибавляют обычно агар-агар или желатин.

*Агар*, получаемый из некоторых морских водорослей, уникален тем, что большинство микроорганизмов не используют его в качестве субстрата для роста. В воде он образует гель, который плавится при температуре примерно 100 °С и затвердевает при температуре около 40 °С. Необходимо учитывать, что агар сохраняет свои свойства при рН, близком к нейтральному.

*Желатин* – белок, получаемый из костей, хрящей и кожи животных. Образующий им гель плавится при температуре 24–26 °С. Многие микроорганизмы продуцируют ферменты, разлагающие желатин, поэтому его главным образом используют для определения протеолитической активности микроорганизмов с целью их идентификации.

По назначению выделяют: *основные* (общеупотребительные) среды, предназначенные для культивирования микроорганизмов, как то: мясопептонный бульон (МПБ) и мясопептонный агар (МПА); *элективные* (избирательные)

среды – для преимущественного выделения определенной группы микроорганизмов, для которых характерна общность физиологических свойств (минерально-солевая среда «К»); *специальные* среды – для выявления роста бактерий, которые не растут на универсальных средах, например, желточная среда Мак-Коя и Чепина (для получения роста возбудителя туляремии); *диагностические* среды – для быстрого разграничения микроорганизмов разных видов. Среда должны быть стерилизованы непосредственно после приготовления.

### ***Стерилизация***

В практической работе под стерилизацией понимают методы, применяемые для уничтожения всех форм жизни как на поверхности, так и внутри стерилизуемых объектов. Микробиологи стерилизуют питательные среды, посуду, различные инструменты и другие необходимые предметы с целью не допустить развития посторонних микроорганизмов в исследуемых культурах.

Различают *термическую* и *холодную* стерилизации. В микробиологии находят применение следующие способы термической стерилизации: прокаливание в пламени и обжигание, сухожаровая стерилизация (180–220 °С), стерилизация текучим паром, насыщенным паром под давлением (автоклавирование), кипячение. Из методов холодной стерилизации в микробиологии используют стерилизацию фильтрованием, химическими веществами и дезинфицирующими растворами, ультрафиолетовыми лучами и другими видами излучений.

### **Практическая работа**

*Материалы, оборудование.* Конические колбы с пробками на 100, 250, 1000 мл. Цилиндр на 100 мл. Стеклянные пробирки с ватно-марлевыми пробками. Стерильные чашки Петри. Диски фильтровальной бумаги диаметром 90 мм. Упаковочный материал. Дистиллированная вода. Питательный агар. Сухие минеральные соли. Углеводороды. Автоматические пипетки (дозаторы). Весы технические. Сухожаровой шкаф. Автоклав.

#### **1. Записать правила работы и поведения в микробиологической лаборатории**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## 2. Дать характеристику микробиологическим средам

*по физическому состоянию:*

плотные

---

полужидкие

---

жидкие

---

*по составу:*

естественные

---

синтетические

---

полусинтетические

---

---

*по назначению:*

консервирующие

---

элективные

---

дифференциально-диагностические

---

---

### 3. Дать характеристику способам стерилизации

Материал	Методы стерилизации	Условия стерилизации
Чашки Петри (стекло)		
Пипетки (стекло)		
Наконечники для дозаторов (пластик)		
Питательные среды без сахаров		
Питательные среды с сахарами и витаминами		

### 4. Изучить составы разных питательных сред и заполнить таблицу

Среда	Тип среды по составу	Способ приготовления	Назначение среды
Мясопептонный агар (МПА)		Размешать 38,5 г порошка, содержащего пептон, мясной экстракт и агар-агар, в 1000 мл дистиллированной воды до растворения комков. Стерилизовать два раза автоклавированием при 1 атм, 30 мин. Охладить до 45–50 °С, разлить в стерильные чашки Петри по 20–30 мл (слоем 4–6 мм)	
Минерально-солевая среда «К»		Растворить в воде (г/л): $\text{KNO}_3$ – 1,0; $\text{NaCl}$ – 1,0; $\text{MgSO}_4$ – 0,2; $\text{CaCl}_2$ – 0,02; $\text{FeCl}_3$ – 0,001; $\text{KH}_2\text{PO}_4$ – 1,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4$ – 1,0; агар – 15. Стерилизовать два раза автоклавированием при 0,5 атм. Охладить до 45–50 °С, разлить в стерильные чашки Петри по 20–30 мл (слоем 4–6 мм). Стерильно добавить смесь углеводов $\text{C}_{12}$ – $\text{C}_{16}$ (1,0 % v/v) в качестве единственного источника углерода и энергии	
0,5%-ный раствор хлорида натрия		Растворить 5 г $\text{NaCl}$ в 1000 мл дистиллированной воды. Разлить по пробиркам. Стерилизовать автоклавированием при 1 атм	

## 5. Приготовить питательные среды и растворы

### Процедура

**А.** Приготовить 500 мл МПА в колбе на 1000 мл согласно прописи. Для этого добавить 500 мл дистиллированной воды в колбу.

Сделать расчет количества сухого порошка для приготовления питательной среды: если на 1000 мл питательного агара необходимо \_\_\_\_\_ г сухого порошка, то \_\_\_\_\_ г необходимо для приготовления 500 мл МПА. Взвесить требуемое количество и добавить в колбу. Перемешать до растворения порошка. Закрыть колбу ватно-марлевой пробкой, прикрыть бумажным колпачком сверху и закрепить резинкой на горлышке. Написать название среды «МПА» и режим стерилизации «1,0 атм».

**Б.** Приготовить 500 мл минеральной среды "К" в колбе на 1000 мл. Для этого добавить 500 мл дистиллированной воды в колбу. Взвесить каждый ингредиент согласно прописи из расчета на 500 мл среды:

\_\_\_\_\_ г  $\text{KNO}_3$ ; \_\_\_\_\_ г  $\text{NaCl}$ ;  
\_\_\_\_\_ г  $\text{MgSO}_4$ ; \_\_\_\_\_ г  $\text{CaCl}_2$ ;  
\_\_\_\_\_ г  $\text{FeCl}_3$ ; \_\_\_\_\_ г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  
\_\_\_\_\_ г  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; \_\_\_\_\_ г агар-агара.

Перемешать до растворения ингредиентов. Закрыть колбу ватно-марлевой пробкой, прикрыть бумажным колпачком сверху и закрепить резинкой на горлышке. Написать название среды «К» и режим стерилизации «0,5 ати».

**В.** Приготовить 100 мл 0,5%-ного р-ра  $\text{NaCl}$  в колбе на 250 мл. Какое количество дистиллированной воды и  $\text{NaCl}$  необходимо для этого?

Г. С помощью пипетки разлить по 9 мл 0,5%-ного р-ра  $\text{NaCl}$  в 6 пробирок. Закрыть пробирки ватно-марлевыми пробками, поместить в банку, прикрыть ее бумажным колпачком сверху и закрепить резинкой. Написать название р-ра «0,5%  $\text{NaCl}$ » и режим стерилизации «1,0 атм».

## 6. Подготовить материалы

### Процедура

**А.** Завернуть в упаковочную бумагу одну коробку с наконечниками для пипеток на 1 мл и одну коробку с наконечниками на 0,2 мл. Маркировать коробки с указанием объема наконечников и режима стерилизации «1,0 атм».

**Б.** Поместить 10 круглых бумажных фильтров диаметром, равным крышке чашки Петри, в стакан и накрыть бумажным колпачком. Стерилизовать при 1,0 атм.

**В.** Приготовить 100 мл дистиллированной воды в колбе на 250 мл, закрыть колбу ватно-марлевой пробкой, прикрыть бумажным колпачком и закрепить резинкой на горлышке. Стерилизовать при 1,0 атм.

**Г.** Пустую колбу на 100 мл закрыть ватно-марлевой пробкой, прикрыть бумажным колпачком сверху и закрепить резинкой на горлышке. Стерилизовать при 1,0 атм.

**Д.** Поместить колбы, пробирки и другие подготовленные материалы в корзину, отнести на стерилизацию в автоклавную комнату.

**Е.** После автоклавирования все материалы охладить до комнатной температуры. Что произошло с агаром в питательной среде?

---

---

---

---

---

## **7. Разлить питательные среды в чашки Петри**

### *Процедура*

Колбу со стерильным питательным агаром поместить на водяную баню (45 °С) и нагреть ее до жидкого состояния среды. Питательный агар должен быть разлит в чашки Петри асептически (без посторонней микрофлоры в среде).

### *Процедура*

**А.** Зажать пробку колбы между пальцев и, удерживая ее, открыть колбу. Обжечь горло колбы, пронося ее через пламя.

**Б.** Приоткрыв крышку стерильной чашки Петри, налить среду на дно слоем 5 мм. Закрыть крышку и повторить процедуру с другой чашкой. При этом держать колбу под углом. Разлить среду таким образом во все чашки. Пустую колбу закрыть пробкой и отставить в сторону.

**В.** Через 15 мин после застывания среды в чашках перевернуть их вверх дном для предотвращения попадания конденсата на агаровую пластинку. Поместить чашки в термостат с температурой 36 °С, чтобы подсушить среду.

## **Заключение**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### **Контрольные вопросы**

1. Укажите температуру насыщенного пара при давлении в автоклаве:

0,5атм \_\_\_\_\_?

1,0 атм \_\_\_\_\_?

1,5 атм \_\_\_\_\_?

2. Тиндализация – это

3. Какие вещества используют в качестве индикаторов контроля температуры в автоклаве?

Подпись преподавателя \_\_\_\_\_

# ЗАНЯТИЕ 2

## УСТРОЙСТВО СВЕТОПОЛЬНОГО МИКРОСКОПА И ПРАВИЛА РАБОТЫ С НИМ

Дата \_\_\_\_\_

### Задачи

1. Изучить правила работы и устройство микроскопа.
2. Разобрать принцип и порядок работы с фазово-контрастным устройством.
3. Ознакомиться с правилами установки освещения по Кёллеру.
4. Освоить работу с иммерсионной системой микроскопа.

### Введение

*Микроскоп* – оптический прибор, дающий обратное изображение изучаемого объекта. Позволяет рассматривать детали строения организмов, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности глаза. Различают две основные системы микроскопа – механическую и оптическую.

*Механическая система* включает: штатив с фокусирующим устройством для грубой и точной настройки; коаксиально (совмещённо) расположенные рукоятки настройки фокуса; револьверное устройство для крепления объективов; тубус (моно-, би-, тринокулярный); предметный столик, регулируемый по высоте; ирисовые диафрагмы.

*Оптическая система* включает: коллектор с регулируемой полевой диафрагмой; конденсор с регулируемой апертурной диафрагмой; объективы; окуляры.

*Объектив* – система линз, которые в совокупности дают нужное увеличение. Все основные сведения об объективе можно найти на металлическом корпусе современных объективов: производитель (Zeiss / Olympus / Micros и др.), линейное увеличение (10x / 40x / 100x и др.); числовая апертура (0,25 / 0,65 / 1,25 и др.); иммерсия (Oil / W / Glycerin / Mucilage): метод контрастирования (Phase Contrast / DIC); коррекция аберраций (недостатков) линз (Achromatic / Plan / Apochromatic); тубусное расстояние (160 / ∞); покровное стекло (стандарт – 0,17, без стекла – 0).

Важно обратить внимание на цветную маркировку объективов, которая помогает быстро выбрать нужный объектив: цветная кодировка кратности уве-

личения (красная – 5х, желтая – 10х, синяя – 40х, белая – 100х), цвет надписи (черный – стандарт, зеленый – фазовый контраст и др.); вид иммерсионной жидкости (черный – масло, белый – вода и др.).

*Окуляр* – система из 2 и более линз. Предназначен для рассматривания изображения, формируемого объективом, т. е. выполняет роль лупы. На корпусе окуляров указано: линейное увеличение (10х, 15х, 20х и др.), линейное поле зрения, мм (118, 20, 22); возможность использования очков, возможность фокусировки для близоруких и дальнозорких.

*Увеличение микроскопа* определяется как увеличение объектива, умноженное на увеличение окуляра. Однако общее увеличение не отражает всех возможностей микроскопа. Увеличенное изображение может быть нечетким. Отчетливость изображения определяется разрешающей способностью микроскопа, которая зависит от длины волны используемого света ( $\lambda$ ) и числовой апертуры объектива (A1) и конденсора (A2). В свою очередь, разрешающая способность – есть величина, обратная пределу разрешения (d), который определяется по формуле

$$d = \lambda / (A1 + A2).$$

Таким образом, чем меньше предел разрешения (минимальное расстояние, до которого две точки не сливаются в одну), тем выше разрешающая способность микроскопа. Используя более короткие лучи для освещения объекта, например, ультрафиолетовые, выбирая объектив с большой числовой апертурой и применяя конденсор, можно добиться максимальной разрешающей способности для микроскопа и увидеть структурную организацию клетки и даже крупные вирусы.

*Числовая апертура (A)* от латинского «*aperture*» отверстие – это безразмерная величина, которая является мерой количества света и определяется размерами линз или диафрагмами при прохождении света.

Её определяют по формуле

$$A = n \times \sin 1/2 \alpha,$$

где  $n$  – показатель преломления среды, граничащей с фронтальной линзой объектива;  $\alpha$  – угол светового конуса лучей, входящих в объектив. Числовая апертура линзы, граничащей с воздухом, не может быть больше 1, так как коэффициент преломления воздуха равен 1, а половина угла  $\alpha$  не может быть больше  $90^\circ$ , значит,  $\sin 1/2 \alpha \leq 1$ .

Если между фронтальной линзой объектива и исследуемым объектом поместить каплю жидкости, можно повысить числовую апертуру объектива. Максимальный показатель преломления таких жидкостей, называемых иммерсионными, имеет кедровое масло ( $n = 1,5$ ). Для работы с иммерсией используют специальные иммерсионные объективы (кодировка Oil), имеющие пружинящую оправу для предохранения от механических повреждений фронтальной линзы объектива и объекта.

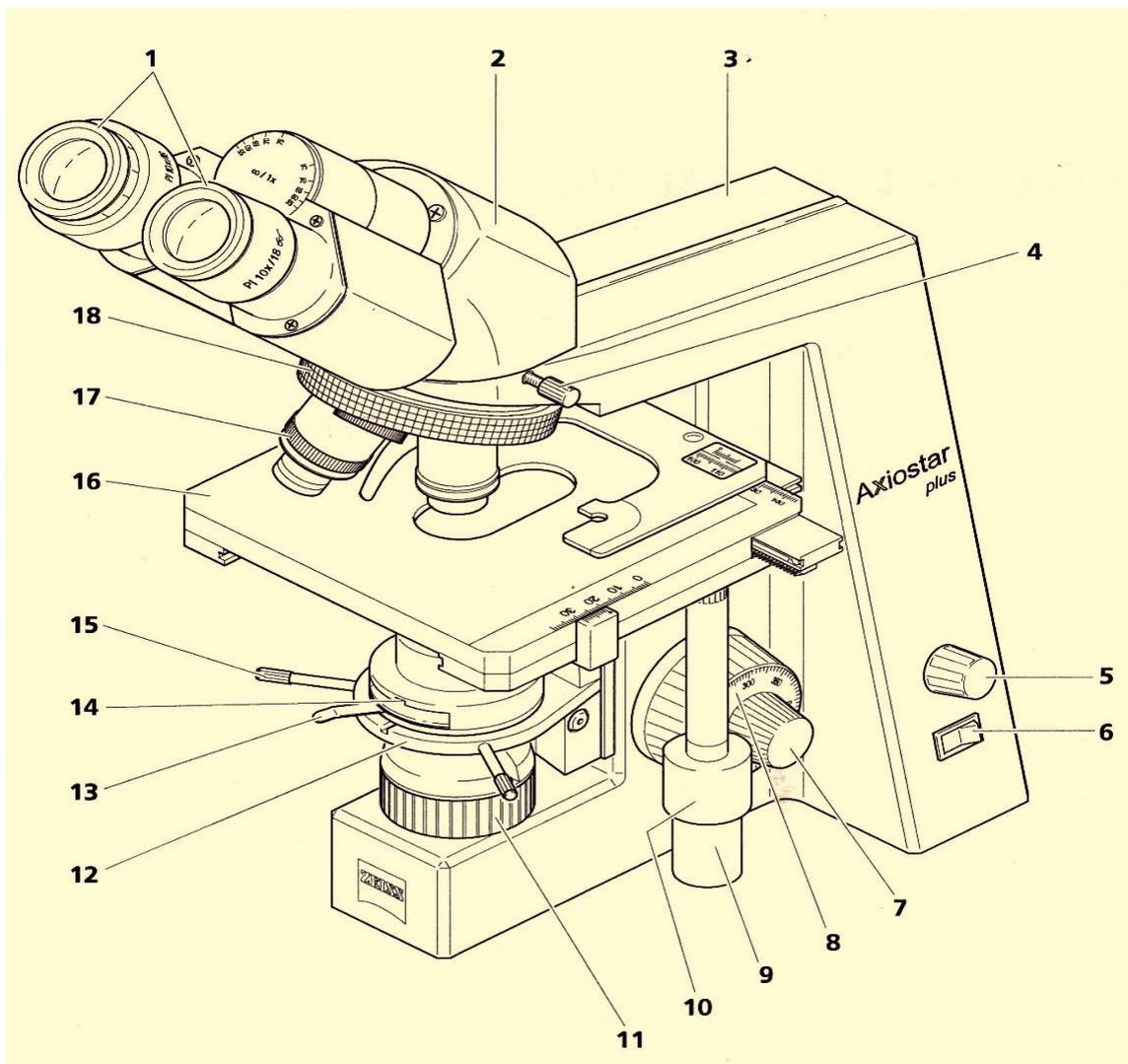
*Фазово-контрастное устройство.* Неокрашенные клетки микроорганизмов хорошо видны в светлом поле зрения микроскопа при условии использования различных устройств для контрастирования. Микроскопия с фазово-контрастным устройством основана на преобразовании невидимых глазу фазовых изменений в видимые, – *амплитудные* – при прохождении световых лучей через препарат. В результате объект становится контрастным. Оптическая система для получения фазового контраста состоит из фазовой пластинки, расположенной в объективе (прозрачный диск с напылённым кольцом), и кольцевой диафрагмы, расположенной под конденсором (светонепроницаемый диск с прозрачной кольцевой щелью). Конструктивно фазово-контрастное устройство – это набор специальных фазовых объективов с маркировкой «Ph» и конденсор с набором кольцевых диафрагм, каждая из которых соответствует фазовой пластинке определенного объектива (Ph1, Ph2, Ph3). Кольцевые диафрагмы установлены в револьверном диске конденсора Зернике и поворотом диска могут легко меняться.

## **Практическая работа**

*Бактериальные культуры, материалы, оборудование.* Фиксированные коммерческие препараты культур для настройки освещения по Кёллеру. Иммерсионное масло. Микроскоп.

### **1. Устройство микроскопа**

Ниже необходимо перечислить, и указать на рисунке основные части светового микроскопа (рисунок).



Внешний вид лабораторного микроскопа Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия)

## 2. Установка освещения по Кёллеру

Хорошие результаты при работе с микроскопом могут быть получены только при условии правильного освещения объекта. Лучший метод основан на системе Кёллера.

### *Процедура*

**А.** Установить препарат на предметный столик. Ввести в ход лучей объектив 10х. Разместить препарат на расстоянии примерно 10 мм до объектива.

**Б.** Выбрать вставку для реализации светлого поля (HF) в конденсоре Зернике.

**В.** Включить питание и медленно повернуть ручку настройки яркости для установки комфортной для глаз интенсивности освещения.

**Г.** Установить конденсор в самое верхнее положение.

Д. Открыть полностью ирисовую диафрагму осветителя и диафрагму конденсора.

Е. Используя винт грубой настройки фокуса, поднять столик, фокусируя объект. Затем, используя винт точной настройки, подстроить фокус для детального просмотра препарата.

Ж. Закрывать почти полностью полевою ирисовую диафрагму осветителя, оставив только небольшое отверстие.

З. Глядя в окуляры, слегка опускать конденсор и четко фокусировать в плоскости препарата изображение краев ирисовой диафрагмы осветителя. Открыть диафрагму осветителя настолько широко, чтобы полностью свести к нулю расстояние между краем диафрагмы и границей микроскопического изображения (не более чем на  $2/3$ ).

И. Работая с объективом 100х, диафрагму конденсора открыть полностью. Микроскоп готов к работе.

### **3. Правила работы с иммерсионной системой**

#### *Процедура*

А. Каплю иммерсионной жидкости нанести на препарат, не размазывая ее по стеклу. Установить препарат на предметный столик.

Б. Глядя на препарат сбоку, поднимать столик до поверхности масляной капли (до видимой вспышки света) макровинтом.

В. Глядя в окуляры, осторожно погружать объектив в масло, продолжая вращать макровинт. Найти плоскость препарата. При появлении изображения навести резкость с помощью микровинта.

Г. Наблюдать препарат, двигая его под объективом на предметном столике в двух взаимно перпендикулярных направлениях с помощью препаратопроводителя.

Д. По окончании работ опустить столик, снять препарат и протереть линзу объектива кусочком фильтровальной бумаги, затем хлопчатобумажной салфеткой, слегка смоченной очищенным бензином или спиртом.

### **Контрольные вопросы**

1. Как повысить разрешающую способность микроскопа?
2. Рассчитать и сравнить предел разрешения ( $d$ ) микроскопа при использовании:
  - видимого света (длина волны 550 нм) и объектива с апертурой 1,25 \_\_\_\_\_ мкм?

• ультрафиолета (длина волны 200 нм) и объектива с апертурой 1,25 \_\_\_\_\_ мкм?

3. Как регулировать количество света в окулярах микроскопа?

4. Какой из объективов ближе всего устанавливают к препарату при микроскопировании? \_\_\_\_\_ Почему?

Подпись преподавателя \_\_\_\_\_

# ЗАНЯТИЕ 3

## МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИЙ

Дата \_\_\_\_\_

### Задачи

1. Изучить теоретический материал проводимого занятия, ознакомиться с существующим морфологическим разнообразием бактериальных клеток.
2. Приготовить препарат «мазок» из предложенных преподавателем чистых культур бактерий.
3. Просмотреть приготовленные препараты под микроскопом с иммерсионным объективом, заполнить соответствующие разделы рабочей тетради.

### Введение

*Размеры бактерий.* Размеры бактерий выражают в микрометрах (мкм). Один микрометр равен 1000 нм (нанометров). Для сравнения: 1 мм = 10<sup>3</sup> мкм = 10<sup>6</sup> нм = 10<sup>9</sup> пм (пикометров). Типичная бактериальная клетка – приблизительно 1 мкм в диаметре, в то время как большинство эукариотических клеток – от 10 до 100 мкм. В среднем линейные размеры бактерий лежат в пределах 0,5 – 3,0 мкм. Но некоторые бактерии могут иметь гигантские размеры, например: клетки нитчатой серобактерии *Beggiatoa alba* имеют диаметр до 50 мкм; *Achromatium oxaliferum* имеет в длину 15–100 мкм при поперечнике примерно 5–33 мкм, а длина клетки спирохеты может быть до 250 мкм. Самые мелкие из известных прокариотных клеток – микоплазмы диаметром клеток 0,1–0,15 мкм.

*Форма бактерий.* Сферические формы бактерий – кокки после деления могут существовать в виде отдельных клеток, называемых микрококки, или образовывать сочетания клеток различной формы. Кокки, делящиеся в одной плоскости и в одном направлении, могут образовывать пары, связанные клеточным чехлом – диплококки (*diplos* – двойной), или цепочки клеток – стрептококки (*streptos* – цепь). Когда деление происходит равномерно в двух перпендикулярных плоскостях, возникают группы из четырех клеток – тетракокки, а если в трех, то образуются пакеты правильной формы – сарцины (*sarceo* – соединяю). При неравномерном делении в нескольких плоскостях наблюдаются скопления неправильной формы, напоминающие гроздь винограда, – стафило-

кокки (*staphyle* – виноградная гроздь). Цилиндрические формы бактерий имеют вид палочек с прямыми, округлыми или заостренными концами. Они нередко образуют пары или цепочки клеток. Палочковидные бактерии делят на неспорообразующие (бактерии (греч. *bacteria* – палочка)) и спорообразующие (бациллы (лат. *bacillus* – палочка)). Палочковидные бактерии могут располагаться поодиночке, попарно (диплобактерии) и цепочками (стрептобактерии). Особое внимание при описании палочек следует уделять соотношению длина/ширина клетки. Извитые формы бактерий бывают трех типов: вибрионы, спириллы и спирохеты. Вибрионы выглядят как слегка изогнутые палочки. Спириллы имеют два или более крупных завитков, а спирохеты – клетки, с многочисленными мелкими завитками, длина которых во много раз превышает их диаметр.

## **Практическая работа**

*Бактериальные культуры, материалы, оборудование.* Чистые культуры бактерий *Sarcina flava*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli* на чашках Петри. Обезжиренные предметные стекла, микробиологические петли, кристаллизатор, сушилка (салазки), раствор фуксина основного, микроскоп.

### **1. Приготовление препарата «мазок»**

Препараты готовятся на предметных стеклах, толщина которых 1,2 – 1,4 мм. В ином случае изображение получается размытым, так как не соблюдаются условия.

#### *Процедура*

**А.** Чистое обезжиренное предметное стекло пинцетом достают из банки с окрашенным спиртом и проносят через пламя горелки. После сгорания спирта подсушенное стекло кладут на подставку и пипеткой в центр его наносят небольшую каплю воды.

**Б.** В правую руку берут металлическую петлю и прокаливают её в пламени горелки. Затем охлажденной петлей отбирают небольшое количество бактериальной культуры и вносят её в каплю воды, которая в дальнейшем распределяется по поверхности стекла тонким слоем.

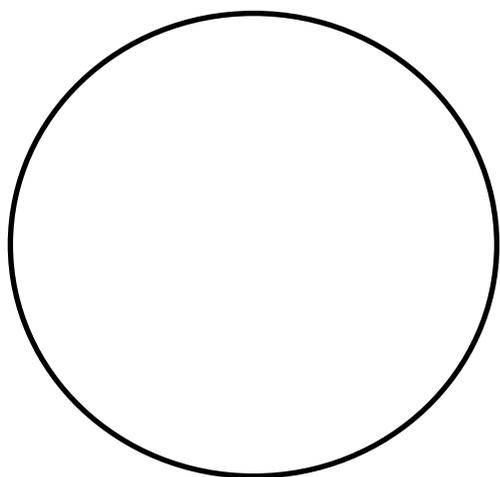
**В.** Высушивание мазка лучше всего проводить при комнатной температуре. Хорошо приготовленный тонкий мазок высыхает достаточно быстро. Если высыхание происходит медленно, то препарат сушат в струе теплого воздуха на расстоянии 20 см от пламени горелки.



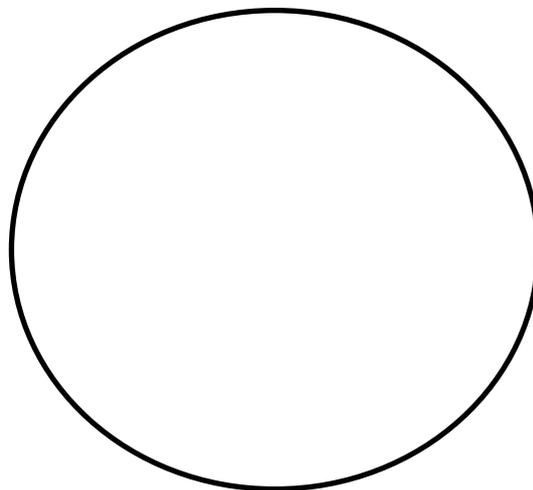
**Б.** На эту зону наносят каплю иммерсионного масла, в которую с помощью макрометрического винта, опуская тубус микроскопа, вводят объектив, имеющий черную риску (иммерсионный объектив). Эту операцию следует проводить очень осторожно, поскольку фронтальная линза иммерсионного объектива довольно слабо держится в оправе и при грубом обращении может сместиться.

**В.** После погружения объектива в масло осторожно, также пользуясь макровинтом, поднимают тубус и, наблюдая в окуляр микроскопа, находят окрашенную плоскость препарата и проводят точную фокусировку объекта. Меняя поле зрения путем медленного перемещения предметного стекла, просмотреть препарат и найти наиболее хорошую зону с окрашенным объектом.

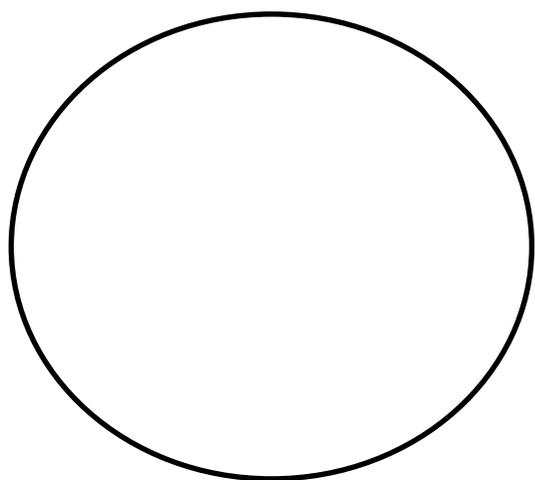
**Г.** Зарисовывают в тетрадь морфологию микроскопируемых клеток (ниже):



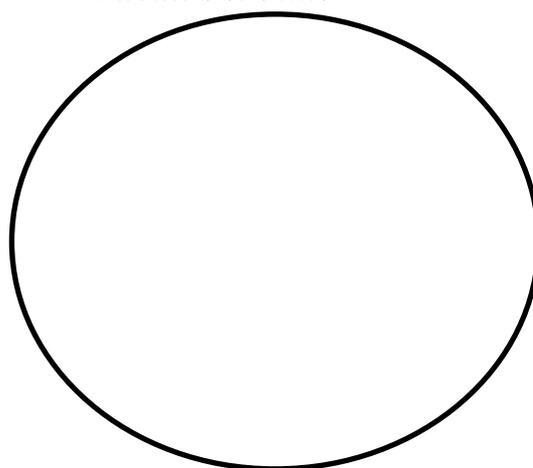
*Sarcina flava*



*Bacillus subtilis*



*Bacillus megaterium*



*Escherichia coli*

Д. После просмотра преподавателем препарата с помощью макровинта поднимают тубус микроскопа и осторожно протирают фронтальную линзу объектива мягкой салфеткой, смоченной бензином.

### **Задания**

В периоды высыхания препаратов мазок выполните следующие задания:

Схематически нарисуйте ход лучей от источника освещения к объективу микроскопа без иммерсионного масла и в его присутствии. На схеме укажите (снизу вверх): источник освещения, светособирающая линза, конденсор, предметный столик, предметное стекло, иммерсионное масло (*б*) и объектив микроскопа

*а) без иммерсионного масла*

*б) с иммерсионным маслом*

Аргументируйте необходимость использования иммерсионной системы в микроскопии

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Контрольные вопросы

1. В каких пределах варьируются размеры бактериальных клеток

---

---

2. Какими подвидами морфологии обладают кокки:

---

---

3. Объясните разницу между бациллами и клостридиями:

---

---

4. Почему клетки прокариот не могут быть таких размеров, как эукариотические

---

---

---

---

---

---

5. Почему препарат «мазок» удобнее готовить с края предметного стекла

---

---

---

---

## Тестовые задания

Выберите и отметьте один правильный ответ

**1. Скопления бактерий, напоминающие внешне грозди винограда, называются :**

- а) стафилококками;
- б) сарцинами;
- в) стрептококками;
- г) диплококками.

**2. Скопления бактерий, образующих цепочку клеток, называются):**

- а) стафилококками;
- б) сарцинами;
- в) стрептококками;
- г) диплококками.

**3. Бактерии, располагающиеся попарно, называются:**

- а) стафилококками;
- б) сарцинами;
- в) стрептококками;
- г) диплококками.

**4. Какие микроорганизмы относятся к извитым формам?**

- а) вибрионы, клостридии, бациллы, кокки;
- б) стрептококки, диплококки, сарцины;
- в) вибрионы, спирохеты, спириллы;
- г) микоплазмы, спирохеты, бактерии.

**5. Скопления бактерий, образующих правильные кубические пакеты, называются:**

- а) стафилококками;
- б) сарцинами;
- в) стрептококками;
- г) диплококками.

Подпись преподавателя \_\_\_\_\_

# ЗАНЯТИЕ 4

## КЛЕТОЧНАЯ СТЕНКА БАКТЕРИЙ

Дата \_\_\_\_\_

### Задачи

1. Провести окраску бактерий по Граму в три этапа:

- а) обработка комплексом красителей и промывка водой;
- б) обработка спиртом и промывка водой;
- в) обработка фуксином и промывка водой.

Приготовленные препараты каждого из этапов просмотреть под микроскопом и результаты наблюдений отметить в тетради.

2. Провести идентификацию грамположительных и грамотрицательных бактерий, используя КОН- метод.

### Введение

*Клеточная стенка* (CW – от англ. *cellular wall*) является важным и обязательным компонентом для большинства прокариотических организмов. Она служит механическим барьером между протопластом и внешней средой и придает клетке определенную, присущую ей форму. В 1884 г. Грамом был разработан метод комплексного окрашивания бактерий йодом с фиолетовым красителем. При последующей обработке клеток этиловым спиртом и промывке водой у одних видов бактерий (грамположительных) данный комплекс остается в клетке, и они окрашиваются в синий цвет, а у других (грамотрицательных) комплекс вымывается, и они обесцвечиваются. Способность или неспособность окрашиваться по Граму, что связано с различиями в строении клеточной стенки, является важным диагностическим признаком и позволяет разделить бактерии на две большие группы.

Исследование химического состава клеточной стенки показало, что ее основным компонентом является *муреиновый комплекс* (в современной литературе – пептидогликановый каркас), составляющий у грамположительных бактерий основную массу клеточной стенки, а у грамотрицательных – около 10%. Муреиновый комплекс представлен гетерополимером пептидогликаном, построенным на основе чередующихся остатков ацетилглюкозамина и ацетилму-

рамовой кислоты, связанных  $\beta$ -1,4-гликозидной связью. Соседние молекулы пептидогликана поперечно сшиты пептидной цепочкой, состоящей из четырех аминокислот: L-аланин, D-глутаминовая кислота, мезо-диаминопимелиновая кислота и D-аланин.

Характерной особенностью данного пептида является то, что синтез его идет не на рибосомах, а при участии ферментов, и в состав его входят аминокислоты D-формы, редко встречающиеся в пептидах как у про-, так и у эукариот. Таким образом, пептидогликан представляет собой одну гигантскую молекулу, сшитую при помощи гликозидных и пептидных связей.

У *грамположительных* бактерий клеточная стенка состоит из мощного многослойного муреинового каркаса, а у *грамотрицательных* муреиновый комплекс однослойный. Другим отличием грамположительных бактерий является присутствие в составе клеточной стенки тейховых кислот, которые прочно связаны с муреиновым комплексом.

## Практическая работа

*Бактериальные культуры, материалы, оборудование.* Чистые культуры бактерий *Sarcina flava*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* на чашках Петри. Обезжиренные предметные стекла, микробиологические петли, кристаллизатор, сушилка (салазки), раствор фуксина основного, раствор генцианового фиолетового, раствор Люголя, 96%-ный этиловый спирт, 3%-ный КОН, микроскоп.

### 1. Окраска по Граму

Для интенсивной окраски по Граму рекомендуется использовать клетки молодых, чаще всего односуточных культур микроорганизмов.

Почему необходимо проводить и параллельное окрашивание микроорганизмов, отношение которых к окраске по Граму заранее известно?

Ответ:

---

---

---

---

Почему необходимо сделать один «смешанный» препарат из всех предложенных культур на одном предметном стекле?

Ответ:

---

---

---

---

---

### *Процедура*

**А.** Приготовление мазка. На обезжиренное предметное стекло нанести исследуемый материал в каплю дистиллированной воды и равномерно распределить его петлей на площади  $\frac{3}{4}$  стекла более тонким слоем. Почему тонкий мазок лучше плотного?

---

---

---

**Б.** Высушивание мазка. Препарат высушить при комнатной температуре на воздухе.

**В.** Фиксация (прикрепление) клеток к стеклу. Преследует несколько целей: предохранить препарат от смывания; сделать мазок более восприимчивым к окраске, поскольку мертвые клетки окрашиваются лучше, чем живые; сделать безопасным дальнейшее обращение с мазком. Фиксацию клеток осуществлять над пламенем горелки. Для этого препарат трижды провести через наиболее горячую часть пламени, держа предметное стекло мазком вверх. Мазок не перегревать.

### **Г.** Окраска

- Фиксированный препарат поместить на сушилку, покрыть полоской фильтровальной бумаги (для получения более чистых препаратов) и залить карболовым генциановым фиолетовым на 1–2 мин, следя за тем, чтобы краситель не подсыхал.

- Краситель слить и, не промывая препарат водой, обработать раствором Люголя в течение 1–2 мин до почернения.

- Слить раствор Люголя и обработать препарат 96%-ным этиловым спиртом в течение 0,5–1,0 мин для обесцвечивания, погружая и слегка покачивая предметное стекло в стаканчике со спиртом. Препарат промыть водой. Аргументируйте, следует ли просушивать препарат после смывания красителей водой до обработки спиртом?

Ответ:

---

---

---

---

---

---

---

---

- Дополнительно окрасить 1–2 мин водным фуксином.

Д. По окончании окраски препарат промывать водой до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной.

Е. Высушить на воздухе или осторожно промокнуть фильтровальной бумагой.

## **2. КОН – метод определения грам-типа бактерий**

Метод основан на разрушении клеточной стенки грамотрицательных бактерий в щелочной среде и определении освобождённой ДНК.

### *Процедура*

А. На предметное стекло нанести одну каплю 3%-ного водного р-ра КОН.

Б. В каплю щелочи поместить культуру микроорганизмов с агаризованной среды и тщательно перемешать. Выдержать 1 мин.

Клетки грамотрицательных бактерий придадут капле вязкость, грамположительных – нет.

КОН-метод является экспресс-методом и проводится параллельно окраске по Граму. Иногда визуально сложно отличить вязкую каплю с клетками грам(-) и жидкую с бактериями грам(+). До начала выполнения метода напишите, как лучше визуально сравнить вязкость капель для более надежной диагностики

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Наблюдения и результаты

1. Микроскопировать окрашенный по Граму препарат под объективом 100х с масляной иммерсией. Определить грам-принадлежность исследуемых микробных культур.

У *грамположительных* бактерий комплекс, образуемый генциановым фиолетовым и йодом, удерживается при обработке спиртом и дает **сине-фиолетовое** окрашивание.

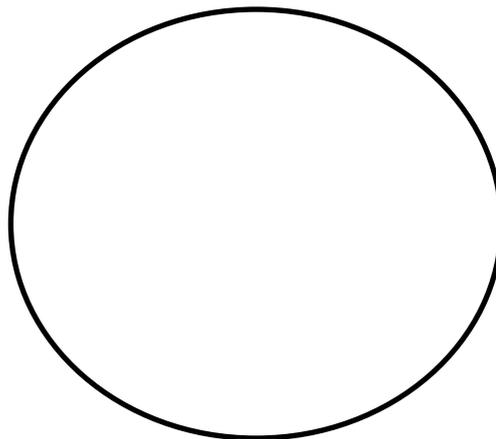
У *грамотрицательных* бактерий комплекс отмывается при обработке спиртом, а при дополнительном окрашивании фуксином клетки приобретают **красный** цвет.

2. Перечислить этапы процедуры окрашивания по Граму, указать цвет грамположительных и грамотрицательных клеток после каждого этапа.

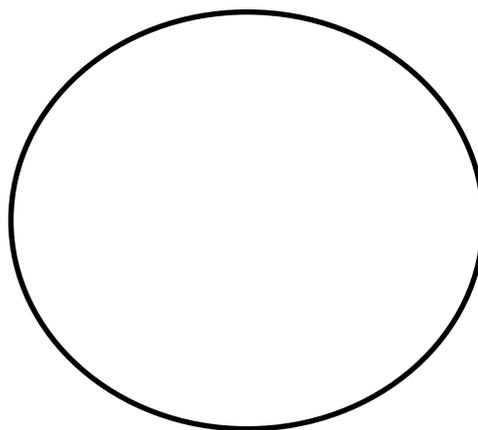
Этап	Реактив	Внешний вид клеток (цвет)	
		Грам(+)	Грам(-)
Фиксация	--		
Окраска	Генциановый фиолетовый		
Обработка	Раствор Люголя		
Обесцвечивание	96%-ный этиловый спирт		
Докрашивание	Фуксин		

3. Зарисовать окрашенные клетки. Описать морфологию и характер взаимодействия клеток друг с другом. Указать грам-принадлежность бактериальной культуры.

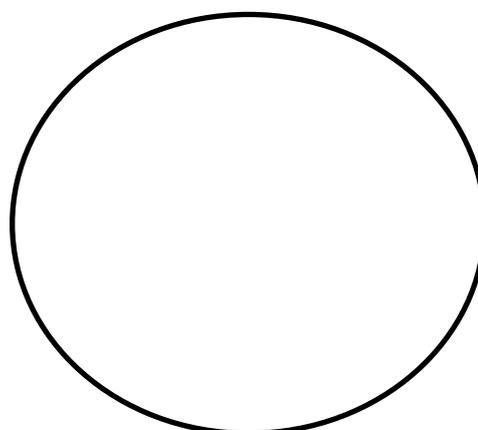
Культура \_\_\_\_\_  
Морфология \_\_\_\_\_  
Цвет \_\_\_\_\_  
Грам-принадлежность \_\_\_\_\_



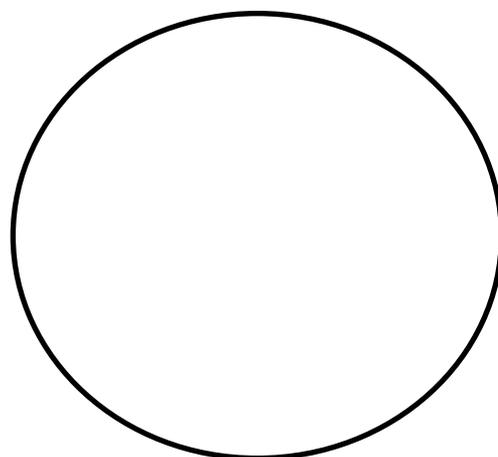
Культура \_\_\_\_\_  
Морфология \_\_\_\_\_  
Цвет \_\_\_\_\_  
Грам-принадлежность \_\_\_\_\_



Культура \_\_\_\_\_  
Морфология \_\_\_\_\_  
Цвет \_\_\_\_\_  
Грам-принадлежность \_\_\_\_\_



Культура \_\_\_\_\_  
Морфология \_\_\_\_\_  
Цвет \_\_\_\_\_  
Грам-принадлежность \_\_\_\_\_



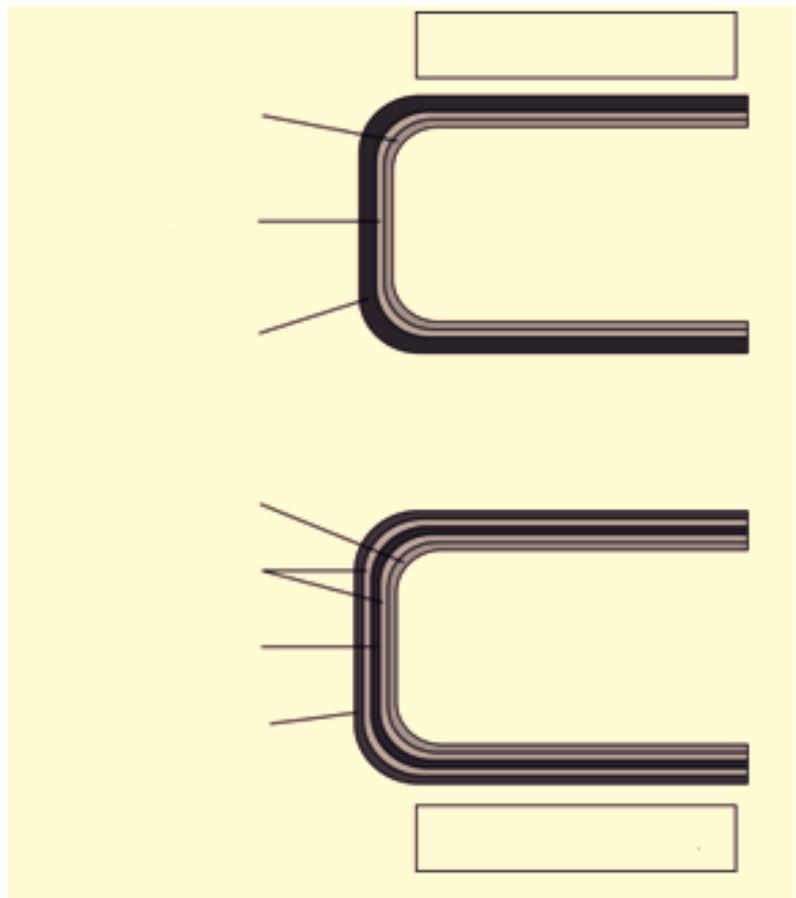
**4.** Определить грам-принадлежность исследуемых бактериальных культур КОН-методом.

Если в течение 0,5–1,0 мин суспензия становится вязкой, желеобразной, то анализируемая культура *грамотрицательная*. Если же смесь остается гомогенной, не становится желеобразной, то культура *грамположительная*.

Культура				
Грам-принадлежность				

### Контрольные вопросы

1. Указать, какая мембрана принадлежит грамотрицательным, а какая – грамположительным бактериям. Вписать названия основных компонентов клеточной стенки:



2. Из каких чередующихся мономеров состоит гетерополимер пептидогликан?

---



---



---

3. Назовите особенности поперечной пептидной сшивки в составе пептидогликана:

---

---

---

4. Опишите отличия клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий:

---

---

---

5. Каковы функции периплазматического пространства?

---

---

---

6. Чем отличаются ОМ и СМ?

---

---

---

### Тестовые задания

Выберите и отметьте один правильный ответ

**1. Особенностью пептидного мостика в молекуле пептидогликана НЕ является (один правильный ответ):**

- а) наличие L-аминокислот;
- б) синтез не на рибосомах;
- в) наличие тейхоевых кислот;
- г) наличие диаминопимелиновой кислоты.

**2. Дополнительная наружная мембрана (ОМ) в составе клеточной стенки отсутствует у клеточного морфотипа (выберите один правильный ответ):**

- а) грамотрицательный;
- б) грамположительный;
- в) грациликотный;
- г) трихомный.

**3. Клеточная стенка бактерий не выполняет функцию:**

- а) осуществление транспорта веществ;
- б) выполняет каталитическую функцию;
- в) защищает от внешних воздействий;
- г) определяет антигенную структуру.

**4. Для клеточной стенки грамположительных бактерий не характерно:**

- а) наличие одно-, двухслойного муреинового мешка;
- б) наличие многослойного муреинового мешка;
- в) наличие тейхоевых кислот;
- г) наличие мезодиаминопимелиновой кислоты.

Подпись преподавателя \_\_\_\_\_

# ЗАНЯТИЕ 5

## СПОРЫ БАКТЕРИЙ

Дата \_\_\_\_\_

### Задачи

1. Провести окраску эндоспор по методу Пешкова с метиленовым синим (раствор Лёффлера).
2. Провести окраску эндоспор по методу Ауески.
3. Провести окраску эндоспор по методу Шеффера-Фултона.
4. Приготовить препарат «агаровая пленка» для наблюдения за разными стадиями эндоспорообразования.

### Введение

Бактерии рода *Bacillus*, *Clostridium* и *Plectridium* способны образовывать споры (эндоспоры) – тельца сферической или эллиптической формы, устойчивые к воздействию неблагоприятных факторов. Как правило, внутри бактериальной клетки образуется только одна спора. Однако в последнее время у отдельных видов *Clostridium* обнаружены клетки с двумя и более спорами. Обычно спорообразование начинается, когда бактерии испытывают недостаток питательных веществ или когда в среде в большом количестве накапливаются продукты обмена веществ бактерий. Поэтому споры можно рассматривать как приспособление организма для выживания в неблагоприятных условиях среды.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что споры бактерий – уникальные по структуре и свойствам образования, не имеющие аналогов по степени устойчивости к неблагоприятным факторам среды. Формирование спор зависит от условий роста. Споры могут оставаться живыми в условиях, когда вегетативные клетки, то есть клетки, не образующие споры, погибают. Для уничтожения спор требуется температура пара 120°C при давлении его 1 атм. При этих условиях споры погибают через 20 мин.

Общая схема спорообразования может быть представлена в следующем виде. В результате деления бактериальной клетки, сопровождающегося выпячиванием цитоплазматической мембраны, наблюдается обособление двух протопластов, при этом один из них накрывается другим.

Дальнейшее развитие споры заключается в образовании нескольких слоев спорных покровов и ее созревании. Диаметр споры приблизительно равен

диаметру клетки, в которой она образовалась, или несколько превышает его. Споры имеют вид плотных сильно преломляющих свет телец овальной или сферической формы. В зависимости от расположения спор клетки имеют различную форму. Споры могут образовываться в центре клетки, не вызывая изменение ее формы, – бациллярный тип; в центре клетки и изменять ее форму – кластридиальный тип; на конце клетки, придавая ей вид барабанной палочки, – плектридиальный тип.

После созревания споры клеточная стенка вегетативной части клетки разрушается, и спора выходит в окружающую среду. При попадании в благоприятные условия спора начинает прорастать. Споры бактерий могут длительное время (десятки, сотни и даже тысячи лет) существовать в покоящемся состоянии.

## Практическая работа

*Бактериальные культуры, материалы, оборудование.* Чистые культуры бактерий *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Plectridium sp.*, *Clostridium sp.* на чашках Петри. Обезжиренные предметные стекла, микробиологические петли, кристаллизатор, сушилка (салазки), раствор метиленового синего по Лёффлеру, 0,5%-ный водный раствор нейтрального красного, 1–2 %-ный раствор соляной кислоты, раствор фуксина основного, 7,5%-ный раствор малахитового зеленого, 0,25%-ный водный раствор сафранина. Для приготовления препарата «агаровая плёнка»: чистые культуры бактерий *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Plectridium sp.*, *Clostridium sp.*, выращенные на БТН-бульоне, стерильные предметные стёкла, стерильный БТН-агар, стерильные пастеровские пипетки, стерильные чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой.

### 1. Приготовление препаратов эндоспор по методу Пешкова

Объясните, почему все методики окрашивания бактериальных спор требуют временного нагревания препаратов с определенными красителями?

---

---

---

---

---

#### *Процедура*

**А.** Приготовление мазка. На обезжиренное предметное стекло нанести исследуемый материал в каплю дистиллированной воды и равномерно распределить его петлей на площади  $\frac{3}{4}$  стекла тонким слоем.

**Б.** Высушивание мазка. Препарат высушить при комнатной температуре на воздухе.

**В.** Мазок заливают раствором метиленового синего по Лёффлеру и начинают нагревать над пламенем спиртовки в течение 20 сек от начала кипения красителя.

**Г.** Остывший препарат промывают дистиллированной водой

**Д.** Мазок подсушивают и докрашивают 30 сек 0,5%-ным водным раствором нейтрального красного.

**Е.** Мазок вновь промывают водой, подсушивают и микроскопируют под иммерсией.

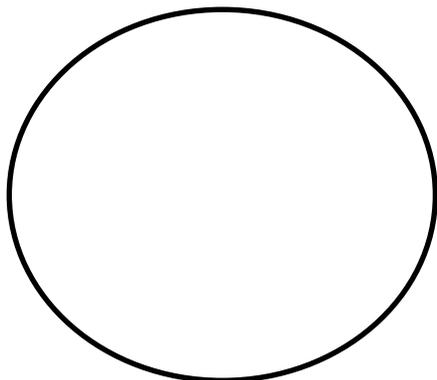
Какого цвета становятся эндоспоры и цитоплазма клетки при использовании данного метода окрашивания?

---

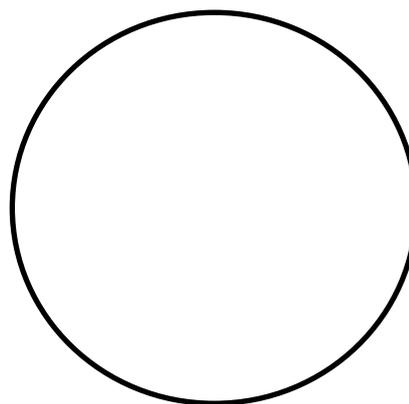
---

---

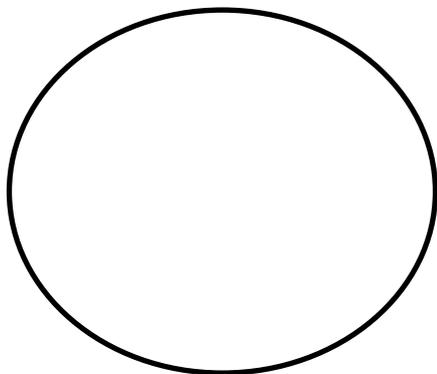
Зарисуйте наблюдаемые объекты, отметьте расположение споры.



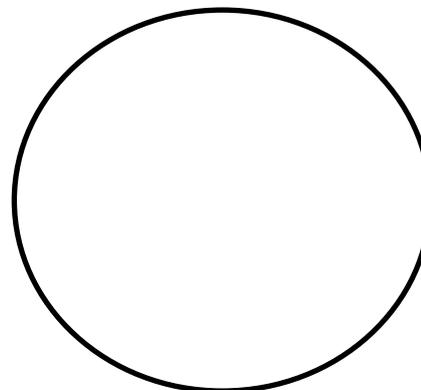
*Bacillus subtilis*



*Bacillus megaterium*



*Plectridium sp.*



*Clostridium sp.*

## 2. Приготовление препаратов эндоспор по методу Ауески

### *Процедура*

**А.** На приготовленный высушенный мазок наливают 1–2 %-ный раствор соляной кислоты и подогревают на пламени до появления паров (3–4 раза).

**Б.** Препарат обильно промывают водой, высушивают и фиксируют над пламенем спиртовки.

**В.** Мазок окрашивают раствором фуксина при нагревании (до появления паров) в течение 3–5 мин, накрыв фильтровальной бумагой.

**Г.** Препарат обесцвечивают 5 %-ным раствором серной кислоты в течение нескольких секунд (16–18 с).

**Д.** Промывают водой и дополнительно окрашивают метиленовым синим в течение 2 мин. Промывают водой и высушивают.

**Е.** Микроскопируют с иммерсионной системой. При микроскопии видны споры (красные) и вегетативные клетки (синие).

Ответьте на вопрос: какие биохимические компоненты оболочек споры обеспечивают им кислото – и термолабильность.

---

---

---

---

---

Перечислите основные оболочки эндоспоры

---

---

---

---

---

Напишите, зачем используется предварительное протравливание эндоспор слабым раствором серной кислоты перед основным окрашиванием?

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---



### 3. Приготовление препарата «агаровая пленка»

Препарат «агаровая пленка» (или «микрокультура») готовится студентами на проводимом занятии, но микроскопирование проводится на следующем, так как клетки в препарате должны размножиться и войти в стадию спорообразования. Для этого требуется от 3 до 5 дней.

#### *Процедура*

**А.** На тонкое стерильное предметное стекло наносят стерильной нагретой пипеткой 0,3 мл горячей стерильной агаризованной питательной среды и распределяют по всей поверхности прокаленной микробиологической петлей.

**Б.** После застывания среды удаляют петлей весь лишний агар стерильной препаровальной иглой, оставляя два тонких участка пленки величиной с покровное стекло каждый.

**В.** В центр получившихся квадратов дозатором наносят 1 мкл суспензии клеток микроорганизмов.

**Г.** Стекло помещают во влажную камеру (чашка Петри со слоем влажной фильтровальной бумаги), которую ставят в термостат.

**Д.** Культивируют бактерии 1 – 5 суток при температуре 37°C.

**Е.** Перед микроскопированием препарат подкрашивают метиленовым синим по Леффлеру (слегка нагревая) и накрывают покровным стеклом. Микроскопируют под иммерсией.

Аргументированно напишите, почему препарат «агаровая пленка» микроскопируют последовательно, двигаясь от края получившейся бактериальной колонии к центру?

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---





**4. Какие виды покоящихся клеток существуют у бактерий, кроме эндоспор? (два правильных ответа)**

- а) гормогонии;
- б) акинеты;
- г) персистеры;
- д) гетероцисты.

**5. На какой стадии эндоспорообразования происходит формирование кортекса?**

- а) 1-я стадия;
- б) 2-я стадия;
- в) 3-я стадия;
- г) 4-я стадия.

**6. Эндоспорообразованию способствует:**

- а) недостаток питательных веществ;
- б) высокая плотность популяции;
- г) накопление продуктов обмена в периодической культуре;
- д) все вышеперечисленное.

Подпись преподавателя \_\_\_\_\_

# ЗАНЯТИЕ 6

## БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЕНКИ

Дата \_\_\_\_\_

### Задачи

1. Вырастить биопленку бактерий различных видов на полистироловой поверхности и провести ее окраску.
2. Определить показатели, характеризующие биомассу биопленки и удельное биопленкообразование исследуемых бактерий.
3. Сравнить исследуемые бактерии по способности к формированию биопленок.

### Введение

Микробные биопленки – это сообщества микроорганизмов, закрепившихся и существующих на биогенном или абиогенном субстрате и окруженных полимерным матриксом. Биопленки формируются на границе раздела твердой и жидкой или твердой и газообразной фаз. В структуре биопленок можно выделить два основных компонента: бактериальные клетки и внеклеточный матрикс.

Клетки в биопленках могут принадлежать как к одному, так и к разным видам или включать несколько групп неродственных микроорганизмов. В состав биопленки могут входить живые и погибшие клетки. Живые микроорганизмы различаются по их отношению к действию различных неблагоприятных факторов. В составе биопленки выявляется субпопуляция клеток, которые невосприимчивы к действию многих факторов, в том числе антибиотиков. Такие клетки, как правило, находятся в стадии физиологического покоя («клеточного анабиоза»).

Внеклеточный матрикс, который продуцируется микроорганизмами, состоит из комплекса органических соединений и заполняет все пространство между клетками. В его состав входят белки, липиды, нуклеиновые кислоты, однако основным компонентом являются полисахариды. Матрикс выполняет ряд важных функций: повышает прочность биопленки, удерживает воду, обеспечивает перераспределение органических и неорганических молекул, защищает клетки от неблагоприятных воздействий. Компоненты межклеточного матрикса

способны связывать и нейтрализовать многие химические вещества, поступающие из окружающей среды и способные оказывать негативное действие на бактериальные клетки.

Образование биопленок – это сложный комплексный процесс, в котором выделяют несколько основных стадий.

1. Первичная адгезия. На первой стадии биопленкообразования происходит первичное прикрепление микроорганизмов к поверхности (неспецифическая адгезия, сорбция) из окружающей среды (обычно жидкости). Данная стадия обратима.

2. Необратимая адгезия. На этой стадии микробы выделяют внеклеточные полимеры, обеспечивающие прочное прикрепление клеток к субстрату.

3. Созревание. Первый слой клеток, прикрепившихся к поверхности, облегчает прикрепление последующих клеток, а внеклеточный матрикс удерживает вместе всю колонию. Происходит накопление питательных веществ и деление клеток.

4. Дисперсия. Происходит нарушение структуры биопленки и выход части бактерий в среду, где они могут вновь прикрепиться к поверхности и образовать новую колонию.

Существование микроорганизмов в виде биопленок обеспечивает им преимущества по сравнению с изолированными клетками. В этих сообществах они приобретают повышенную способность к выживанию в присутствии агрессивных веществ и устойчивость к антибактериальным препаратам, легко могут обмениваться генами резистентности, становятся невосприимчивыми к антибиотикам, воздействию факторов иммунной системы хозяина, фагоцитозу и др. Установлено, что микроорганизмы в составе биопленок выживают в присутствии антибиотиков с концентрацией в 500–1000 раз больших, чем их минимальная подавляющая концентрация для планктонных форм. Образование биопленки идет достаточно быстро, экспериментально показано, что начальные элементы биопленки могут сформироваться в течение двух часов инкубации, достигая максимальной интенсивности уже через 24 ч.

Биопленки распространены повсеместно. Они обнаруживаются практически на любой твердой поверхности на границе раздела твердой и жидкой фаз. Эти структуры активно используются человеком в хозяйственной деятельности. Микроорганизмы в составе биопленок участвуют в очистке сточных вод, биодеградации трудно разлагаемых субстратов, биотехнологической продукции различных соединений и т.д.

Наличие биопленок является одной из значительных проблем в медицине. Они могут образовываться как на неповрежденных участках тела человека, так и в ранах. Биопленки часто формируются на имплантах (искусственные клапаны сердца, протезы), глазных полимерных линзах и катетерах, попадают в кровяное русло, вызывают сепсис и могут привести к смерти. Лечение антибиотиками становится неэффективным из-за низкой чувствительности микроорганизмов в составе биопленок к антибактериальным препаратам и их быстрой способности приспосабливаться к меняющимся условиям среды за счет высоких адаптивных возможностей. Для патогенных микроорганизмов способность формировать биопленки является одним из факторов патогенности.

## **Практическая работа**

*Бактериальные культуры, материалы, оборудование.* Чистые культуры бактерий *Sarcina flava*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* на жидкой питательной среде (5мл) в пробирках. Стерильные пробирки, чашки Петри, жидкая богатая питательная среда (МПБ). Автоматические дозаторы и стерильные наконечники к ним. Стерильные плоскодонные прозрачные 96-луночные полистироловые планшеты с крышками. 0,1%-ный раствор генцианового фиолетового, 96%-ный этиловый спирт. Планшетный спектрофотометр, термостат, ламинарный бокс.

### **Определение способности бактерий к формированию биопленок**

Самым распространенным методом изучения биопленкообразования в лабораторных условиях является выращивание бактериальных биопленок в лунках полистироловых планшетов с последующей окраской их красителем. После экстракции этанолом сорбированного биопленкой красителя определяется его концентрация и рассчитывается соответствующая ей биомасса биопленки. При необходимости делается пересчет на оптическую плотность культуры и рассчитывается удельное биопленкообразование.

#### **1. Подготовка инокулята и засев культуры в планшеты**

Культуры микроорганизмов, выращенные на жидкой питательной среде в течение ночи, доводят до нужной плотности и засевают в планшеты.

##### *Процедура*

**А.** Измеряют оптическую плотность (ОП) ночной культуры на спектрофотометре или фотоэлектрокалориметре при длине волны 600 нм. О чем свидетельствует оптическая плотность культуры?

Ответ:

---

---

---

**Б.** Разводят культуру стерильной питательной средой до ОП=0,1 в объеме 5 мл в пробирке. Укажите значение полученной оптической плотности и объемы культуры и питательной среды, которые нужно смешать.

Ответ:

---

---

---

**В.** Разводят культуру питательной средой еще в 10 раз, внося в стерильную чашку Петри 2 мл культуры и 20 мл питательной среды. Осторожно перемешивают. Инокулят готов к использованию.

**Г.** В лунки одного ряда (8 лунок) стерильного 96-луночного, плоскодонного полистиролового планшета многоканальным дозатором вносят по 200 мкл инокулята. Аналогичным образом в лунки соседнего ряда вносят инокулят культуры другого микроорганизма. Крайние ряды (1 и 12) заполняют стерильной средой. Поясните, почему это необходимо.

Ответ:

---

---

---

**Д.** Закрытые планшеты инкубируют при 35°C в течение 20—24 ч.

## **2. Окраска биопленок**

### *Процедура*

**А.** Если в дальнейшем будет проводиться расчет удельного биопленкообразования, то на этом этапе необходимо провести измерение оптической плотности культуры в лунках планшета с помощью планшетного спектрофотометра при длине волны 625нм.

В каких случаях требуется расчет удельного биопленкообразования?

Ответ:

---

---

---

---

**Б.** Удаляют культуру из планшета резким встряхиванием.

**В.** С помощью многоканального дозатора дважды промывают планшет 200 мкл дистиллированной воды, после чего высушивают планшет. Поясните, для чего необходима промывка планшета перед окраской?

Ответ:

---

---

---

---

**Г.** Вносят в каждую лунку, где выращивали биопленки, а также в ряд контрольных лунок 150 мкл 0,1%-ного генцианвиолета и оставляют на 30 мин. После чего удаляют краситель.

**Д.** Пятикратно промывают планшет дистиллированной водой (200 мкл) и высушивают его.

**Е.** В окрашенные лунки вносят 200 мкл 96%-ного этанола. Экстракцию красителя этанолом проводят в течение 20 мин.

**Ж.** Измеряют оптическую плотность (ОП) при длине волны 570 нм с помощью планшетного спектрофотометра.

## **2. Расчет биомассы биопленки и удельного биопленкообразования**

**А.** Расчет биомассы биопленки проводят, вычисляя среднее значения по данным в 6 лунках (данные из верхней и нижней лунок не учитывают). Почему не учитываются данные крайних луток планшета?

Ответ:

---

---

---

---

**Б.** Если необходимо, то проводят расчет удельного биопленкообразования по формуле:  $(ОП_{570 \text{ эксп.}} - ОП_{570 \text{ контр.}})/ОП_{625}$ , где

ОП<sub>570 эксп</sub> – оптическая плотность в экспериментальной лунке (с выращенной биопленкой) после экстракции красителя при длине волны 570 нм,

ОП<sub>570 контр</sub> - то же в контрольной лунке (без биопленки),

ОП<sub>625</sub> - оптическая плотность культуры при длине волны 625 нм.

**В.** Внесите данные расчетов в таблицу (ниже)

Определяемый показатель	Вид микроорганизма		
<b>Биомасса биопленки (ОП<sub>570</sub>)</b>			
<b>Удельное биопленкообразование (ед.)</b>			

**Г.** На основании полученных данных сравните исследованные культуры по способности к формированию биопленок.

Ответ:

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Контрольные вопросы

1. Охарактеризуйте основные стадии развития биопленки.

---

---

---



г) имеют более толстую клеточную стенку, чем планктонные.

**2. Матрикс биопленок:**

- а) образован, главным образом, аминокислотами;
- б) вырабатывается только грамположительными бактериями;
- в) образован, главным образом, полисахаридами;
- г) защищает бактерии от внешних воздействий.

**3. Бактериальные биопленки могут образовываться :**

- а) на твердой поверхности, погруженной в жидкость;
- б) на поверхности жидкости;
- в) только грамотрицательными бактериями;
- г) на имплантируемых устройствах в теле человека.

**4. Начальной стадией развития биопленки является:**

- а) формирование выростов на поверхности;
- б) проникновение внутрь организма-хозяина;
- в) синтез большого количества тейхоевых кислот;
- г) первичная обратимая адгезия.

Подпись преподавателя \_\_\_\_\_

# ЗАНЯТИЕ 7

## ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ

Дата \_\_\_\_\_

### Задачи

1. Ознакомиться с принципами классификации антибиотиков, основными группами, химическим строением и механизмами действия, а также с механизмами устойчивости бактерий к антибиотикам различных групп.
2. Провести определение антибиотикочувствительности бактерий диско-диффузионным методом.
3. Провести определение антибиотикочувствительности бактерий методом двукратных серийных разведений.
4. Сравнить исследуемые бактериальные штаммы по чувствительности к антибиотикам.

### Введение

Антибиотики—вещества природного или полусинтетического происхождения, подавляющие рост живых клеток, чаще всего прокариотических или простейших. Из-за огромного разнообразия антибиотиков и их воздействий на клетку и организм человека существует множество классификаций антибиотиков: по мишени в клетке, по действию на микроорганизм (бактерицидные и бактериостатические) и др. Наиболее часто используется классификация по химической структуре.

**Бета-лактамы** объединяет наличие в структуре бета-лактамного кольца. Этот класс состоит из нескольких групп антибиотиков, основными из которых являются: пенициллины и цефалоспорины.

Мишенью действия бета-лактамов в микробной клетке являются транспептидазы и карбоксипептидазы — ферменты, участвующие в синтезе пептидогликана — основного компонента клеточной стенки бактерий (образуют поперечные сшивки между мономерами). Благодаря способности связываться с пенициллинами и другими бета-лактамами эти ферменты получили второе название — пенициллинсвязывающие белки. Связывание бета-лактамов с мишенью обуславливает инактивацию фермента, нарушение синтеза клеточной стенки, выделению тейхоевых кислот в среду, в результате чего активируются ферменты, гидролизующие пептидогликан. В

итоге это приводит к тому, что клеточная мембрана остается без механической опоры и наступает лизис клетки.

Устойчивость к бета-лактамам определяется наличием ферментов бета-лактамаз, гидролизующих антибиотики. В результате горизонтального переноса генов, в том числе между бактериями различных групп, бета-лактамазы широко распространились у различных микроорганизмов, в том числе патогенных.

**Макролиды** – группа антибиотических препаратов преимущественно бактериостатического действия. Основным структурным компонентом макролидов является 12–16-членное лактонное кольцо, к которому присоединены один или несколько углеводных остатков. Большинство макролидных антибиотиков является метаболитами бактерий рода *Streptomyces*. Первым клинически использованным макролидом был эритромицин.

Мишенью макролидов является узкий выходной тоннель большой субъединицы рибосомы, через который должен пройти синтезированный полипептид. Связывание макролидов с внутренней стенкой этого тоннеля закупоривает просвет, что приводит к остановке синтеза белков.

**Тетрациклины** имеют в основе полифункциональное гидронафтаценовое соединение с родовым названием тетрациклин. Механизм действия антибиотиков этой группы состоит в подавлении белкового синтеза. Причиной ингибирования синтеза белков является связывание тетрациклина с рибосомой, которое ослабляет взаимодействие рибосомы с тРНК.

**Аминогликозиды** – это биологически активные соединения, содержащие в молекулах два или более аминсахара, которые соединены гликозидными связями с аминоциклитонным кольцом. К этим антибиотикам относятся стрептомицины, канамицин, гентамицин, амикацин и др. Известно более 100 антибиотиков, относящихся к этой группе соединений. Эти препараты широко применяются в медицинской практике для лечения тяжелых инфекционных заболеваний и, в первую очередь, различных форм туберкулеза. Установлено, что аминогликозиды образуются не только определенными видами стрептомицетов, но и отдельными представителями родов *Micromonospora*, *Pseudomonas* и *Bacillus* и др. Основной мишенью действия аминогликозидов является бактериальная рибосома и связанный с нею синтез белка. Аминогликозиды тормозят образование белковой молекулы на стадии переноса аминоацил-тРНК.

**Хинолоны** – антибиотики, не имеющие природного аналога. Класс хинолонов включает две основные группы препаратов, принципиально различающихся по структуре, активности, фармакокинетике и широте показаний к применению: нефторированные хинолоны (налидиксовая и оксолиновая кислоты) и фторхинолоны (норфлоксацин, офлоксацин, левофлоксацин и др). На сего-

дняшний день разработано 4 поколения фторхинолонов. Ингибируя два жизненно важных фермента микробной клетки - ДНК-гиразу и топоизомеразу-4, фторхинолоны нарушают синтез ДНК, что приводит к гибели бактерий.

### **Механизмы антибиотикорезистентности**

Антибиотики многообразны по своему строению, но все они обладают некоторой общностью действия на микроорганизмы. Во-первых, все антибиотики в той или иной степени сначала адсорбируются на клеточной стенке, во-вторых, антибиотики имеют мишень в клетке, на которую они воздействуют. В соответствии с этими этапами у микроорганизмов существуют механизмы противодействия антибиотикам.

**Задержание на поверхности.** Суть подобных механизмов заключается в том, что антибиотик задерживается на поверхности клетки и не проникает внутрь из-за ухудшения проницаемости или по другим причинам. Это свойство может быть обусловлено снижением связывания антибиотика с поверхностью клетки. Иногда образуются структуры, защищенные внеклеточным покровом, который препятствует проникновению антибиотика непосредственно к клеткам. Скорость проникновения антибиотиков в клетку может быть снижена за счет уменьшения размеров пориновых каналов, через которые «в норме» антибактериальные препараты быстро проникают внутрь бактерий.

**Разрушение или модификация антибиотика.** В основе этого механизма лежит способность некоторых микроорганизмов продуцировать вещества, способные инактивировать антибиотики. Пенициллины, цефалоспорины, аминогликозиды и другие антибиотики легко разрушаются ферментами, продуцируемыми многими видами бактерий. Так, различные штаммы стафилококков, бактерии рода *Vacillus* и многие виды грамотрицательных бактерий образуют ферменты бета-лактамазы, амидазы, инактивирующие молекулы пенициллинов, цефалоспоринов и других бета-лактамных антибиотиков. Показано, что в клетках бактерий образование бета-лактамаз кодируется как хромосомными генами, так и генами плазмид. Таким образом, устойчивость многих видов бактерий к пенициллину связана с образованием ими ферментов (бета-лактамазы, или пенициллинамидазы), разрушающих молекулу антибиотика. Эти факторы резистентности определяют около 80% случаев устойчивости бактерий. В целях предотвращения возникновения резистентных форм бактерий к бета-лактамным антибиотикам совместно с антибиотиками применяют ингибиторы бета-лактамаз (клавулановую кислоту, сульбактамы, тазобактам). Резистентность бактерий к эритромицину и другим макролидам связана с образованием ферментов типа фосфотрансфераз. Резистентность к тетрациклинам достигается благодаря ФАД-зависимой монооксигеназе, модифицирующей молекулу

антибиотика. У гидроксированной формы препарата снижается сродство к рибосоме. Кроме того, гидроксированный тетрациклин подвергается не ферментативному разложению. Так как для гидроксирования необходим кислород, такой вид резистентности работает только у бактерий, растущих в аэробных условиях.

**Активный выброс антибиотика** осуществляется посредством специализированных насосов – помп множественного лекарственного выброса (Efflux pumps), имеющих белковую природу, которые обнаружены у многих видов бактерий. Резистентные микроорганизмы благодаря системе энергозависимого выброса эффективно снижают концентрацию антибиотика внутри клетки и таким образом защищают себя от негативного действия препаратов.

**Модификация мишени действия антибиотика.** Изменение ответственного за чувствительность микробной клетки к антибиотику звена (мишени) – один из существенных факторов, определяющих появление резистентных форм. Устойчивость грамположительных бактерий (стафилококков, энтерококков) к бета-лактамам иногда связана с тем, что у этих бактерий происходит изменение конформации мишеней. Например, проявление резистентности у *Staphylococcus aureus* связано с возникновением нового пенициллинсвязывающего белка. Устойчивость к хинолонам возникает в результате изменений двух основных целевых ферментов: ДНК-гиразы и топоизомеразы IV.

### **Перенос генов антибиотикорезистентности**

Перенос генов может происходить в результате конъюгации, трансдукции или посредством транслоцирующихся элементов, а также за счет мутаций в хромосомных и плазмидных генах. Было установлено, что устойчивость штаммов бактерий к лекарственным препаратам определяется наличием плазмид, передаваемых при конъюгации. Фактор устойчивости (R-фактор) – это комплекс генов; часть из них ответственна за устойчивость к одному или нескольким антибактериальным препаратам, другие облегчают «заражение» фактором устойчивости одной микробной клетки от другой. Плазмиды, несущие гены устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, обнаруживаются практически у всех групп патогенных бактерий. Поэтому частота резистентности к антибиотикам обусловлена, в первую очередь, распространением генов, детерминирующих устойчивость. Перенос генов устойчивости может происходить не только внутри клеток одного вида, но и у различных видов и родов микроорганизмов. Устойчивость бактерий к антибиотикам, обусловленная R-факторами, существует даже у микроорганизмов, полученных из природных мест обитания (загрязненных водоемов, почвы).

Наряду с плазмидами, ответственными за устойчивость бактерий к антибиотикам, в бактериальных клетках имеются так называемые мигрирующие элементы, одни из которых (транспозоны)—сложные структуры, иногда содержащие гены, связанные с резистентностью к антибиотикам. Источниками генов резистентности способны служить продуценты многих антибиотиков, передавая их с помощью различных механизмов другим микроорганизмам, в том числе и патогенным.

Определение чувствительности бактерий к антибиотикам имеет большое значение для практической медицины с точки зрения эффективности антибиотикотерапии. Кроме того, показатели чувствительности к различным антибиотикам могут использоваться в качестве одного из этапов идентификации природных изолятов бактерий, поскольку некоторые группы микроорганизмов обладают природной устойчивостью к некоторым антибиотикам.

## **Практическая работа**

*Бактериальные культуры, материалы, оборудование.* Чистые культуры бактерий *Escherichia coli* K12 и *Escherichia coli* K12 pBR322 на жидкой питательной среде (5мл) в пробирках. Стерильные пробирки, чашки Петри, жидкая питательная среда Мюллер-Хинтон, чашки Петри с агаризованной питательной средой Мюллер-Хинтон (20 мл на чашку). Автоматические дозаторы и стерильные наконечники к ним. Стерильные плоскодонные прозрачные 96-луночные полистироловые планшеты с крышками. Растворы антибиотиков, диски с антибиотиками. Термостат, ламинарный бокс.

### **Определение антибиотикочувствительности бактерий**

Современные стандартизованные методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (АБП) подразделяют на методы серийных разведений и диффузионные. Методы серийных разведений основаны на прямом определении основного количественного показателя, характеризующего активность АБП – величины его минимальной подавляющей концентрации (МПК). МПК – минимальная концентрация, подавляющая видимый рост исследуемого микроорганизма в бульонной культуре. Для определения МПК заданные концентрации АБП вносят в питательную среду, которую затем засевают культурой исследуемого микроорганизма и после инкубации оценивают наличие или отсутствие видимого роста.

Диффузионные методы определения чувствительности основаны на диффузии АБП из носителя в плотную питательную среду и подавлении роста исследуемой культуры в той зоне, где концентрация АБП превосходит МПК. В

диско-диффузионном методе в качестве носителя АБП используют бумажный диск. Образование зоны подавления роста происходит в результате диффузии АБП из носителя в питательную среду. В определенных пределах величина диаметра зоны подавления роста обратно пропорциональна МПК. Оба метода позволяют отнести исследуемый микроорганизм к одной из категорий чувствительности (чувствительный, промежуточный или резистентный). Для оценки чувствительности используют богатую питательную среду (среда Мюллера-Хинтона). В методе двукратных серийных разведений используют жидкую питательную среду, тогда как для диско-диффузионного метода необходима агаризованная среда.

Все этапы работы с культурой и средой осуществляются стерильно, с использованием стерильной посуды в ламинарном шкафу.

### **Подготовка инокулята**

#### *Процедура*

Культуры микроорганизмов, выращенные на жидкой питательной среде в течение ночи, доводят до нужной плотности и засевают в планшеты. Для этого:

**А.** Измеряют оптическую плотность (ОП) ночной культуры на спектрофотометре или фотоэлектрокалориметре при длине волны 600 нм.

**Б.** Разводят культуру стерильной питательной средой до  $ОП=0,1$  в объеме 5 мл в пробирке. Укажите значение измеренной оптической плотности и объемы культуры и питательной среды, которые нужно смешать.

Ответ:

---

---

---

---

---

**В.** Разводят культуру питательной средой еще в 100 раз, внося в стерильную чашку Петри 0,4 мл культуры и 40 мл питательной среды. Осторожно перемешивают. Инокулят готов к использованию.

### **Метод двукратных серийных разведений в бульоне**

#### *Процедура*

**А.** В лунки стерильного 96-луночного, плоскодонного полистиролового планшета многоканальным дозатором разливают по 100 мкл питательной среды.

**Б.** В первые лунки рядов вносят 100 мкл рабочего раствора исследуемых антибиотиков (концентрация 0,4 г/л).

**В.** Многоканальным дозатором перемещают из лунок 1-го ряда в лунки 2-го по 100 мкл, затем из лунок 2-го в лунки 3-го и т.д. Эту процедуру повторяют, пока не будет приготовлен весь необходимый ряд разведений. Из последнего ряда лунок 100 мкл бульона удаляют. Таким образом, получают ряд лунок с растворами АБП, концентрации которых отличаются в соседних лунках в 2 раза.

**Г.** В лунки с антибиотиком вносят по 100 мкл инокулята.

**Д.** Верхний ряд планшета заполняют 200 мкл питательной среды, не внося инокулят (контроль стерильности). В лунки нижнего ряда вносят 100 мкл среды и 100 мкл инокулята, не добавляя АБП (положительный контроль).

Почему в данном методе необходимо ставить положительный и отрицательный контроль?

Ответ:

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**Е.** Закрытые планшеты инкубируют в термостате при 35°C в течение 20–24 ч.

**Ж.** Учет результатов проводят визуально или спектрофотометрически, сравнивая рост микроорганизма в присутствии АБП с ростом культуры в лунке без АБП. За МПК принимают минимальную концентрацию, обеспечивающую полное подавление видимого роста исследуемого микроорганизма.

Проводя расчет концентраций антибиотиков в лунках планшета, следует учитывать, что концентрация в первой лунке после приготовления разведений и внесения культуры уменьшается в 4 раза по сравнению с исходной.

### **Диско-диффузионный метод (ДДМ)**

Принцип ДДМ определения чувствительности основан на способности АБП диффундировать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности агар.

### *Процедура*

**А.** Растопленную агаризованную питательную среду разливают по 20 мл в чашки Петри (диаметр 90 мм). После заполнения чашки оставляют при комнатной температуре для застывания. Перед инокуляцией необходимо проконтролировать отсутствие конденсата жидкости на внутренней поверхности крышек.

Почему при постановке данного метода необходимо наливать в чашки Петри фиксированный объем агаризованной среды?

**Б.** Инокулят наносят пипеткой на поверхность чашки Петри с питательной средой в объеме 1–2 мл, равномерно распределяют по поверхности покачиванием, после чего удаляют избыток инокулята пипеткой. Приоткрытые чашки подсушивают при комнатной температуре в течение 10–15 мин.

**В.** На поверхность питательной среды наносят диски с АБП. Апликацию дисков проводят с помощью стерильного пинцета. Расстояние от диска до края чашки и между дисками должно быть 15—20 мм. Диски должны равномерно контактировать с поверхностью агара, для чего их следует аккуратно прижать пинцетом.

**Г.** Чашки Петри помещают в термостат кверху дном и инкубируют при температуре 35°C в течение 18—24 ч.

**Д.** Для учета результатов после окончания инкубации чашки помещают кверху дном на темную матовую поверхность. Диаметр зон задержки роста измеряют с точностью до 1 мм линейкой или штангенциркулем (рисунок)



Оценка результатов определения антибиотикочувствительности  
диско-диффузионным методом

## Учет и интерпретация результатов

Интерпретация результатов оценки антибиотикочувствительности заключается в отнесении исследуемого микроорганизма к одной из трех категорий.

- Чувствительный – рост микроорганизма подавляется при концентрациях АБП, создающихся в органах и тканях человека при рекомендуемых режимах дозирования.

- Промежуточный – МПК АБП в отношении штаммов микроорганизмов этой категории выше, чем в отношении чувствительных, но находится в пределах, достижимых при рекомендуемых режимах дозирования.

- Устойчивый – рост не подавляется при концентрациях АБП, создающихся в органах и тканях при рекомендуемых режимах дозирования. Для устойчивых штаммов характерно наличие определенных механизмов резистентности. Лечение инфекции, вызванной микроорганизмом, относящимся к этой категории, скорее всего, будет неэффективным.

Интерпретация осуществляется на основании сопоставления результатов исследования (величины МПК АБП или диаметра зоны подавления роста) с пограничными значениями этих параметров, отделяющих чувствительные штаммы от промежуточных и промежуточные от устойчивых (табл. 2).

## Метод двукратных серийных разведений в бульоне

Проведите расчет концентраций в каждой лунке одного горизонтального ряда планшета и внесите результаты в табл 1 (ниже)

Таблица 1. Расчет концентраций антибиотика

Исходная концентрация антибиотика	Концентрация антибиотика в лунке											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Рассматривая планшет снизу, определите, в какой лунке находится МПК антибиотика. Исходя из значений табл. 1 определите величину МПК для каждого антибиотика. Впишите величину МПК для каждого исследуемого штамма в табл. 3.

## Диско-диффузионный метод

После инкубации тщательно, с точностью до 1 мм измерьте диаметр зоны подавления роста вокруг дичка с антибиотиком (рисунок). Результаты измерений внесите в табл. 4.

Используя табл. 2 проведите анализ чувствительности штаммов к исследуемым антибиотикам. Результаты запишите в табл. 4.

Таблица 2. Критерии интерпретации результатов определения чувствительности бактерий семейства *Enterobacteriaceae*: пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) и МПК (мг/л) АБП

Антибактериальные препараты	Содержание в диске, мкг	Ø зон подавления роста, мм			МПК, мг/л		
		Р	П	Ч	Р	П	Ч
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>БЕТА-ЛАКТАМЫ</i>							
Ампициллин	10	≤ 13	14—16	≥ 17	≥ 32	16	≤ 8
Ампициллин /сульбактам	10/10	≤ 11	12—14	≥ 15	≥ 32/16	16/8	≤ 8/4
Амоксициллин /клавуланат	20/10	≤ 13	14—17	≥ 18	≥ 32/16	16/8	≤ 8/4
Тикарциллин /клавуланат	75/10	≤ 14	15—19	≥ 20	≥ 128/2	32/2—64/2	≤ 16/2
Цефалотин	30	≤ 14	15—17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Цефазолин	30	≤ 14	15—17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Цефаклор	30	≤ 14	15—17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Цефамандол	30	≤ 14	15—17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Цефуроксим Na	30	≤ 14	15—17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Цефуроксим аксетил	30	≤ 14	15—22	≥ 23	≥ 32	8—16	≤ 4
Цефокситин	30	≤ 14	15—17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Цефотетан	30	≤ 12	13—15	≥ 16	≥ 64	32	≤ 16
Цефметазол	30	≤ 12	13—15	≥ 16	≥ 64	32	≤ 16
Цефоперазон	75	≤ 15	16—20	≥ 21	≥ 64	32	≤ 16
Цефотаксим	30	≤ 14	15—22	≥ 23	≥ 64	16—32	≤ 8
Цефтриаксон	30	≤ 13	14—20	≥ 21	≥ 64	16—32	≤ 8
Цефтазидим	30	≤ 14	15—17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Цефиксим	5	≤ 15	16—18	≥ 19	≥ 4	2	≤ 1
Цефподоксим	10	≤ 17	18—20	≥ 21	≥ 8	4	≤ 2
Цефтибутен	30	≤ 17	18—20	≥ 21	≥ 32	16	≤ 8

1	2	3	4	5	6	7	8
Цефепим	30	$\leq 14$	15—17	$\geq 18$	$\geq 32$	16	$\leq 8$
Азтреонам	30	$\leq 15$	16—21	$\geq 22$	$\geq 32$	16	$\leq 8$
Имипенем	10	$\leq 13$	14—15	$\geq 16$	$\geq 16$	8	$\leq 4$
Меропенем	10	$\leq 13$	14—15	$\geq 16$	$\geq 16$	8	$\leq 4$
Эртапенем	10	$\leq 15$	16—18	$\geq 19$	$\geq 8$	4	$\leq 2$
<i>АМИНОГЛИКОЗИДЫ</i>							
Канамицин	30	$\leq 13$	14—17	$\geq 18$	$\geq 64$	32	$\leq 16$
Гентамицин	10	$\leq 12$	13—14	$\geq 15$	$\geq 16$	8	$\leq 4$
Тобрамицин	10	$\leq 12$	13—14	$\geq 15$	$\geq 16$	8	$\leq 4$
Нетилмицин	30	$\leq 12$	13—14	$\geq 15$	$\geq 32$	16	$\leq 8$
Амикацин	30	$\leq 14$	15—16	$\geq 17$	$\geq 64$	32	$\leq 16$
<i>ХИНОЛОНЫ</i>							
Налидиксовая кислота	30	$\leq 13$	14—18	$\geq 19$	$\geq 32$	—	$\leq 16$
Норфлоксацин	10	$\leq 12$	13—16	$\geq 17$	$\geq 16$	8	$\leq 4$
Пефлоксацин	5	$\leq 15$	16—21	$\geq 22$	$\geq 8$	4	$\leq 1$
Офлоксацин	5	$\leq 12$	13—15	$\geq 16$	$\geq 8$	4	$\leq 2$
Ципрофлоксацин	5	$\leq 15$	16—20	$\geq 21$	$\geq 4$	2	$\leq 1$
Ломефлоксацин	10	$\leq 18$	19—21	$\geq 22$	$\geq 8$	4	$\leq 2$
Левифлоксацин	5	$\leq 13$	14—16	$\geq 17$	$\geq 8$	4	$\leq 2$
Гатифлоксацин	5	$\leq 14$	15—17	$\geq 18$	$\geq 8$	4	$\leq 2$
<i>ТЕТРАЦИКЛИНЫ</i>							
Тетрациклин	30	$\leq 14$	15—18	$\geq 19$	$\geq 16$	8	$\leq 4$
Доксициклин	30	$\leq 12$	13—15	$\geq 16$	$\geq 16$	8	$\leq 4$
<i>ДРУГИЕ ПРЕПАРАТЫ</i>							
Хлорамфеникол	30	$\leq 12$	13—17	$\geq 18$	$\geq 32$	16	$\leq 8$

Таблица 3. Метод двукратных серийных разведений

<b>Метод двукратных серийных разведений</b>		
Штамм		
Антибиотик	1.	
МПК, мкг/мл		
Группа по чувствительности к антибиотику (Резистентный, переходный, чувствительный)		
Антибиотик	2.	
МПК, мкг/мл		
Группа по чувствительности к антибиотику (Резистентный, переходный, чувствительный)		
Антибиотик	3.	
МПК, мкг/мл		
Группа по чувствительности к антибиотику (Резистентный, переходный, чувствительный)		

Таблица 4. Диско-диффузионный метод

<b>Диско-диффузионный метод</b>		
Штамм		
Антибиотик	1.	
Диаметр зоны подавления роста, мм		
Группа по чувствительности к антибиотику (Резистентный, переходный, чувствительный)		
Антибиотик	2.	
Диаметр зоны подавления роста, мм		
Группа по чувствительности к антибиотику (Резистентный, переходный, чувствительный)		
Антибиотик	3.	
Диаметр зоны подавления роста, мм		
Группа по чувствительности к антибиотику (Резистентный, переходный, чувствительный)		

### **Контрольные вопросы**

1. Что лежит в основе диффузионного метода определения антибиотико-чувствительности?

---



---



---



---



---



---



---



---



---



---



- в) минимальная подавляющая концентрация антибиотика;
- г) радиус зоны подавления роста вокруг диска с антибиотиком.

**3. Рибосомы являются мишенью антибиотиков из групп :**

- а) фторхинолонов;
- б) бета-лактамов;
- в) макролидов;
- г) аминогликозидов.

**4. К основным механизмам антибиотикорезистентности НЕ относится:**

- а) разрушение антибиотика;
- б) снижение проницаемости клеточной оболочки;
- в) модификация мишени;
- г) высокая подвижность микроорганизмов.

Подпись преподавателя \_\_\_\_\_

# ЗАНЯТИЕ 8

## ПОЛУЧЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР И УЧЕТ МИКРОФЛОРЫ ВОЗДУХА

Дата \_\_\_\_\_

### Задачи

1. Провести количественный учет микрофлоры воздуха по седиментационному методу.
2. Дать описание колоний выделенных микроорганизмов.
3. Определить морфологию бактерий, используя препарат «мазок».

### Введение

Несмотря на то, что атмосфера является неблагоприятной средой обитания для микроорганизмов, они находятся в ней постоянно. В атмосфере действуют такие неблагоприятные факторы, как ультрафиолетовое облучение и высушивание, но существуют и благоприятные факторы – в воздухе постоянно присутствуют пылевые частицы, на которых адсорбируются водяные пары и различные соединения. Это может способствовать развитию микроорганизмов.

Все микроорганизмы, находящиеся во взвешенном состоянии и пассивно переносимые токами воздуха, объединяют понятием «аэропланктон». Эти микроорганизмы подчиняются целиком физическим законам, как и любая частица соответствующего размера.

Согласно соответствующим представлениям микроорганизмы могут находиться в воздухе в одной из трех фаз: капельной, капельно-ядерной и пылевой. В капельной фазе бактерии находятся внутри водно-солевой оболочки. По мере высыхания концентрация веществ, растворенных в капле, увеличивается, а на поверхности бактериальной клетки откладываются соли. Такие структуры представляют собой фазу капельных ядер. Связанные с пылевыми частицами клетки микроорганизмов представляют собой пылевую фазу. В этой фазе бактерии наиболее устойчивы к воздействию факторов окружающей среды.

При сочетании высокой влажности воздуха, благоприятной температуры, отсутствия солнечных лучей, наличия питательных веществ могут создаваться условия для размножения отдельных видов бактерий.

Колебания количественного и качественного составов микрофлоры воздуха наблюдаются при смене времен года и зависят от климатических зон. Наиболее высокие концентрации жизнеспособных бактерий выявляются в теплый период года, а наиболее низкие – в зимний. Последнее в первую очередь связано с наличием снежного покрова, который препятствует поступлению почвенной микрофлоры в воздух. Большое влияние на численность микроорганизмов оказывает выпадение осадков в виде дождя и снега, которые удаляют основную массу взвешенных микроорганизмов из воздуха.

Жизнедеятельность человека и его активная преобразующая роль оказывают существенное влияние на характер и численность микрофлоры воздуха. Урбанизация приводит к существенному увеличению в составе воздуха различных веществ: сероводорода, аммиака, окислов азота и серы, органических веществ, что способствует созданию благоприятных условий для развития микрофлоры воздуха.

Микробная загрязненность воздуха имеет непостоянный характер и зависит от многих факторов. Воздух помещений загрязняется во время сухой уборки, чихания и кашля.

*Седиментационный* (лат. *sedimentum* – осадок) метод (по Коху) не обладает большой точностью, но благодаря простоте и доступности широко распространен. Суть метода заключается в осаждении микробных частиц и капель аэрозоля на поверхность плотной питательной среды под действием силы тяжести. Для пересчёта количества микробов на 1 м<sup>3</sup> пользуются формулой В.Л. Омелянского. При этом правилом Омелянского подразумевается, что на поверхности агара в чашке Петри площадью 100 см<sup>2</sup> за 5 мин из воздуха оседает такое количество микробов, которое находится в 10 л воздуха (1:100 м<sup>3</sup>). Если применять чашки одного диаметра при одном сроке экспозиции, то этот метод может быть использован для получения сравнительных данных по бактериальному загрязнению воздуха помещений.

О степени загрязненности воздуха судят в конечном итоге по количеству колоний микроорганизмов, выросших на агаризованной питательной среде

## **Практическая работа**

*Материалы, оборудование.* Чашки Петри с БТН-агаром. Термостат.

### **1. Микробиологический анализ микрофлоры воздуха**

#### *Процедура*

**А.** Поставить открытые чашки Петри с агаризованной питательной средой в двух точках исследуемого помещения (ламинарный бокс, кабинет микро-

биологии, поточная учебная аудитория, коридор, туалет) на 5–15 мин (для определения общей обсемененности воздуха) и на 40 мин (для учета кокковой флоры).

**Б.** После экспозиции чашки закрыть, перевернуть (вверх дном) и поместить в термостат. Посевы инкубировать в термостате при температуре 37 °С в течение 24 ч, а затем 1 сутки при комнатной температуре.

### Наблюдения и результаты

**1.** Подсчитать количество колоний микроорганизмов, выросших на агаризованной среде в чашке Петри, полагая, что каждая колония развивается из одной колониобразующей единицы (КОЕ).

**2.** Определить количество микробов в 1 м<sup>3</sup> воздуха (микробное число) с учетом формулы Омелянского:

$$X = A * 100 * 1000 * 5 / S * 10 * t,$$

где **X** – количество микроорганизмов в 1 м<sup>3</sup> (1000 л) воздуха; **A** – среднее количество выросших колоний в чашке; **S** – площадь поверхности питательного агара в чашке Петри, см<sup>2</sup>; **t** – время экспозиции чашки Петри для определения общей обсемененности воздуха, мин; **5** – время Омелянского, мин; **10** – объем воздуха, л (по Омелянскому); **100** – площадь, см<sup>2</sup> (по Омелянскому); **1000** – искомый объем, л (1 м<sup>3</sup>).

**3.** Заполнить таблицу (ниже) с указанием обследованных помещений лаборатории.

Помещение Время экспозиции, мин	Диаметр чашки, см	Площадь чашки, см <sup>2</sup>	Среднее количество колоний	Микробное число воздуха, X

### Пример расчета микробного числа

(Помещение – бокс; время экспозиции – 5 мин; количество выросших колоний – 2).

1. Рассчитываем площадь питательной среды в чашке Петри по формуле  $\pi r^2$ :  
 **$3,14 * 4,52 = 64 \text{ см}^2$ .**

2. Если на площадь  $64 \text{ см}^2$  за 5 мин осели 2 колониеобразующие единицы, то за это же время по правилу Омелянского на площадь  $100 \text{ см}^2$  осело бы:  **$(2 / 64 * 100) = 3 \text{ КОЕ}$** . Это количество по правилу Омелянского содержалось бы в 10 л воздуха.

3. Соответственно рассчитываем число КОЕ, содержащихся в  $1000 \text{ л}$  ( $1 \text{ м}^3$ ) воздуха:

**$(3 / 10 * 1000) = 300 \text{ КОЕ}$ .**

4. Сделать расчет по своим данным.

---

---

---

---

---

## **2. Описание колоний и морфология бактерий**

Для описания колоний используются культуральные свойства микроорганизмов, к которым относятся прежде всего характерные особенности роста на плотных питательных средах. В зависимости от того, где развивались клетки (на поверхности плотной питательной среды, в толще ее или на дне чашки), различают поверхностные, глубинные и донные колонии. Колонии, выросшие на поверхности среды, отличаются большим разнообразием и являются наиболее существенной особенностью роста микроорганизмов на плотном субстрате. При их описании учитываются следующие признаки:

форма колонии – округлая, амебовидная, ризоидная;

размер колонии – диаметр, колонии в мм;

поверхность колонии – гладкая, шероховатая, складчатая;

блеск колоний – блестящая, матовая, тусклая, прозрачная;

цвет колонии – белая, желтая, красная, серая, фиолетовая.

Глубинные колонии, напротив, довольно однообразны. Чаще всего они по виду похожи на более или менее сплюснутые чечевички, имеющие форму овалов с заостренными концами. Данные колонии имеют вид тонких прозрачных пленок, стелющихся по дну (рис 1, 2).

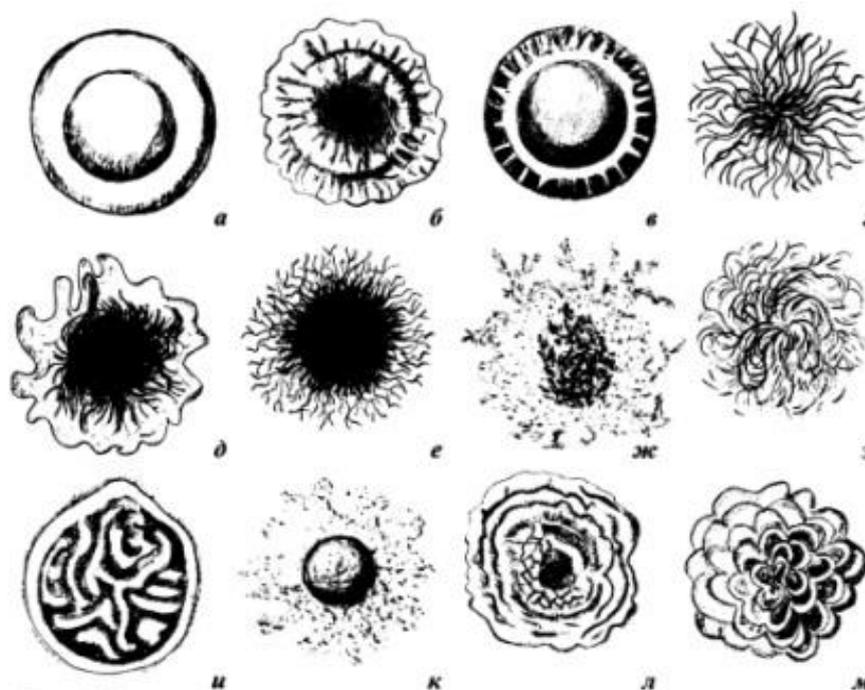


Рис. 1. Внешний вид (форма) колоний:

- а – круглая; б – круглая с фестончатым краем; в – круглая с валиком по краям;  
 г, д – ризоидные; е – круглая с ризоидным краем; ж – амёбовидная;  
 з – нитевидная; и – складчатая; к – неправильная; л – концентрическая;  
 м – сложная



Рис. 2. Профиль колоний:

- а – изогнутый; б – кратерообразный; в – бугристый; г – врастающий в агар;  
 д – плоский; е – выпуклый; ж – каплевидный; з – конусовидный

### Наблюдения и результаты

Используя колонии микроорганизмов, выделенных из воздуха, приготовить препараты для определения окраски бактерий по Граму и на наличие спор, а результаты наблюдения занести в таблицу.

Подсчет, как правило, проводят, не открывая чашек Петри. Для удобства чернилами или карандашом по стеклу отмечают просчитанную колонию точкой на наружной стороне дна чашки. При большом количестве колоний дно чашки Петри делят на сектора, подсчитывают число колоний в каждом секторе и результаты суммируют. Ниже приведен пример оформления таблицы для структурирования записей (таблицу формируют карандашом в разделе «для заметок»):

Кол-во колоний	Описание колоний	Морфология	Окраска по Граму	Споры
4	Круглая, 5мм, блестящая, гладкая, плоская, желтая, однородная, плотная с ровным краем	Кокки	Положительная (+)	Есть (+)

### Контрольные вопросы

1. Почему высеивают на плотные питательные среды и седиментационный анализ в микробиологии называют методом Коха?

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

2. Назовите основные лимитирующие факторы жизни микроорганизмов в воздухе

---

---

---

---

---

---

---

---

3. В какие сезоны года численность микроорганизмов в воздухе максимальна и почему?

---

---

---

---

Подпись преподавателя \_\_\_\_\_

## Список рекомендуемой литературы

Грицкевич Е.Р. Лабораторный практикум по микробиологии. Минск: ИВЦ Минфина, 2017. 113 с.

Громов Б.В. Поведение бактерий // Соросовский образовательный журнал. 1997. №6. С. 32 – 28.

Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология: учебник для студ. биол. специальностей. М.: Издательский центр «Академия», 2003. 464 с.

Еремина И.А., Кригер О.В. Лабораторный практикум по микробиологии: учебное пособие. Кемерово, 2005. 112 с.

Ленгелер Й., Дреус Г., Шлегель Г. Современная микробиология: прокариоты: М. : Мир, 2005. 667 с.

Ленгелер Й., Дреус Г., Шлегель Г. Современная микробиология: прокариоты: М. : Мир, 2005. 510 с.

Лысак В.В., Желдакова Р.А. Микробиология: методические рекомендации к лабораторным занятиям. Мн.: БГУ, 2002. 97 с.

Нестерова Л.Ю., Цыганов И.В., Ткаченко А.Г. Роль биогенных полиаминов в регуляции скольжения микобактерий // Вестник пермского университета. Серия «Биология». 2017. №3. С. 304–310.

Нетрусов А.И., Егорова М.А. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений. М.: Издательский центр «Академия», 2005. 608 с.

Николаев Ю.А., Плакунов В. К. Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. 2007. Т. 76. № 2. С. 149–163.

Пиневиц А.В. Микробиология. Биология прокариотов: учебник в 3 т. СПб.:Изд-во С.–Петерб. ун.-та, 2006. 352 с.

Прунтова О.В. Курс лекций по общей микробиологии и основам вирусологии. Владимир: Изд-во Владим. гос. ун-та, 2006. 192 с.

Прунтова О.В., Сахно О.Н. Лабораторный практикум по общей микробиологии. Владимир: Изд-во Владим. гос. ун-та, 2005. 76 с.

Теппер Е.З., Шильникова В.К. Практикум по микробиологии. М.: Колос, 1979. 216 с.

Тец В. В., Тец Г.В. Микробные биопленки и проблемы антибиотикотерапии // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. 2013. №4 С. 60–64.

Шлегель Г. Общая микробиология. М.: Мир, 1987. 567 с.

Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: метод. указ. МУК 4.2.1890-04. М.: Федеральный центр гос-санэпиднадзора Минздрава России, 2004.91 с.

Naves P. et al. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains // Microbial Pathogenesis. 2008. V. 45. № 2. P. 86–91.

O'Toole G.A., Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development // Molecular Microbiology. 1998. V.30. № 2. P. 295-304

# ПРИЛОЖЕНИЯ

## Приложение 1

### Подготовка микробиологической лаборатории к работе

Для поддержания чистоты моноклональных культур бактерий учебную микробиологическую лабораторию необходимо держать в чистоте. Для предотвращения микробной контаминации (попадание чужеродных микроорганизмов) исследуемых бактерий применяют различные способы дезинфекции. "Дезинфекция"—часто используемый в медицине термин, обозначает уничтожение возбудителей инфекционных болезней на объектах внешней среды. В биологических учебных лабораториях под термином "дезинфекция" следует понимать микробную деконтаминацию как частичное удаление микроорганизмов с объектов внешней среды или из организма человека с помощью стерилизационных факторов.

Воздух в помещении дезинфицируют самым простым способом—проветриванием. Продолжительная вентиляция в течение часа приводит к резкому снижению количества микроорганизмов в воздухе. Для более эффективной деконтаминации воздуха используют облучение ультрафиолетовыми лучами. Чаще всего используют средний диапазон УФ-В (320 –280 нм) и дальний УФ-С (280 -100 нм). Именно эти спектры обладают максимальной антимикробной активностью, воздействуя напрямую на генетический аппарат клетки и систему синтеза белка. Так, УФ-излучение обладает слабой проникающей способностью, то обработку воздуха этим методом проводят с периодичностью каждые 3–4 ч в зависимости от потоковой нагрузки на учебную лабораторию.

Пол, оборудование и стены лаборатории протирают растворами дезинфицирующих веществ. Чаще всего используется 3%-ный раствор хлорамина (или другие хлорсодержащие дезинфектанты).

Рабочее место обрабатывается дезсредствами до начала работы и после ее окончания. В учебных микробиологических лабораториях используются 70%-ный раствор этилового спирта или 3%-ный раствор перекиси водорода.

## Правила работы с культурами микроорганизмов

Работа с чистыми культурами микроорганизмов осуществляется в специальном помещении – микробиологическом боксе. Бокс представляет собой изолированную комнату с минимальным набором предметов. Обычно это стерильный стол, стулья, или спиртовая горелка и бактерицидная лампа. Вход в бокс разрешен только в чистом халате, шапочке, медицинской маске и бахилах. Перед работой помещение бокса моют и дезинфицируют, а после влажной уборки в течение 30–60 мин проводят стерилизацию воздуха бактерицидными лампами.

В современных лабораториях используются ламинарные боксы. Это шкаф, в котором создаются ламинарные потоки стерильного воздуха, поэтому исследуемые культуры максимально защищены от контаминации.

Ламинарные боксы бывают двух степеней защиты: класс I и класс II. В первых воздух помещения, прошедший через бактериальный фильтр, подается в направлении исследователя, в помещение, где проводится работа, поэтому стерильность таких ламинарных боксов низкая. В ламинарах II класса создается замкнутая циркуляция стерильного воздуха. Конструкция позволяет проводить стерильные посевы микроорганизмов (в том числе и патогенных!) в струе стерильного воздуха, распределяемого внутри ламинара.

Студенты на занятиях получают культуры, выращенные на чашках Петри, в стерильных пробирках или планшетах. Так как культуры используются однократно, студенты работают с ними на заранее подготовленных рабочих столах. Лабораторный стол должен быть хорошо освещен солнечным или искусственным светом. За каждой группой студентов закрепляется постоянное рабочее место. В зависимости от темы занятия рабочее место оснащается необходимыми материалами и оборудованием: спиртовкой; штативом под пробирки; бактериологической петлей или препаровальной иглой; набором красок и реактивов для окраски препаратов; микроскопом; лотком с рельсами для размещения предметных стекол при окраске препаратов; промывалкой или колбой с водой и трубкой (для промывки окрашенных препаратов); предметными и покровными стеклами; флаконом с иммерсионным маслом; фильтровальной бумагой; марлей, карандашом или маркером по стеклу и т.д.

Все манипуляции с бактериями проводятся около пламени горелки таким образом, чтобы пламя находилось между исследователем и чашкой Петри (или пробиркой со скошенным агаром). Клетки микроорганизмов для приготовления препаратов с твердой питательной среды берут микробиологической петлей.

Петлю перед взятием образца стерилизуют в пламени горелки. Для этого металлическую проволоку прокалывают докрасна и одновременно прожигают ближайшую к петле часть держателя, которая будет вводиться внутрь сосуда, содержащего микроорганизмы. Нагретую петлю охлаждают о незасеянный слой агара или о стерильную внутреннюю поверхность лабораторной посуды. Затем мягким плавным касанием берут часть бактериальной культуры с микробной колонии, которую хорошо видно на твердом агаре. При избыточно сильном нажатии петлей возможно вместе с исследуемыми клетками взять часть агаризованной питательной среды, что затруднит дальнейшую работу с препаратами. После приготовления необходимого препарата с изъятим образцом бактерий петлю снова стерилизуют прокалыванием.

### Приложение 3

#### **Правила работы с пипетками (дозаторами) переменного объема**

При работе с пипетками необходимо производить отбор образца под правильным углом; требуются предварительная промывка наконечников, правильное заполнение и соответствующая глубина погружения.

*Следует помнить:*

1. Угол погружения пипетки должен быть максимально приближен к  $90^\circ$  и не должен отклоняться более чем на  $20^\circ$  от вертикали. Если угол будет больше, уровень жидкости будет ниже, чем при калибровке пипетки. Это может привести к тому, что в наконечник попадет слишком много жидкости, а это повлияет на точность.

2. Дозируйте образцы с одинаковым стабильным темпом. Не спешите и размеренно выполняйте каждый этап цикла дозирования.

3. При работе с большими объемами (от 1 мл), делайте паузу около 1 сек или больше после отбора образца, не вынимая наконечник из жидкости. Это позволит полностью вобрать образец. Вынимайте наконечник только после завершения отбора образца.

4. Нажимайте и отпускайте поршень плавно, сохраняя одну скорость. Неконтролируемый забор жидкости может привести к образованию пузырьков, брызг и загрязнению ствола и поршня пипетки.

5. Дозируемая жидкость оставляет на наконечнике тонкий слой, поэтому получаемый объем всегда оказывается чуть меньше положенного. При использовании нового наконечника его следует предварительно промывать не менее двух раз в той жидкости, которая будет дозироваться, чтобы компенсировать эту пленку. *Следует помнить:* предварительная промывка может отрицательно

сказаться на результатах при дозировании очень теплых или холодных растворов, так как это может привести к погрешности.

6. Можно добиться высочайшей точности и воспроизводимости результатов от образца к образцу, если жидкость будет полностью выходить из пипетки, не оставаясь на наконечнике. В большинстве случаев при дозировании необходимо, чтобы кончик наконечника опирался на стенку сосуда, так как это уменьшает или полностью устраняет удержание образца. Вынимайте пипетку, скользя наконечником вдоль боковой стенки, чтобы удалить последние капли с отверстия наконечника.

7. Рекомендуемый диапазон дозирования составляет от 35 до 100% номинального объема.

8. Наконечник следует погружать в образец на глубину 1–2 мм для пипеток, предназначенных для микрообъемов, и на 6–10 мм для пипеток, рассчитанных на большие объемы. Если погрузить наконечник слишком глубоко, то это может привести к всасыванию излишнего количества жидкости. Жидкость, задержавшаяся на поверхности наконечника, также может повлиять на точность результатов. Если не погрузить наконечник на достаточную глубину, в него может попасть воздух.

### **Техника пипетирования (прямой метод)**

Прямой метод пипетирования рекомендуется для водных растворов, разбавленной кислоты или щелочи. Метод обычно используется при внесении отобранного объема в другую жидкость с последующим смешиванием путем пипетирования. Для реализации данной техники следуйте рекомендациям:

1. Нажать на поршень дозатора до первой остановки.

2. Погрузить наконечник в раствор и плавно отпустить поршень. Извлечь наконечник с жидкостью.

3. Выпустить взятую жидкость, плавно нажимая на кнопку поршня до первой остановки (упора). После короткой паузы дожать поршень до второго упора. При этом наконечник полностью опустошается. Не отпуская кнопки, вынуть наконечник из раствора.

4. Отпустить поршень, вернув его в исходное положение. При необходимости сменить наконечник и продолжать пипетирование.

## Приготовление основных красителей

Прежде чем готовить рабочие растворы красок, заблаговременно готовят их насыщенные спиртовые растворы. Для этого краски заливают этиловым спиртом в соотношении 1:10 и выдерживают в термостате до полного растворения красок. При этом нерастворимая часть красок выпадает в осадок и её отфильтровывают. Из насыщенных растворов в дальнейшем готовят рабочие растворы.

*Фуксин основной* – солянокислая соль розанилина, блестящие зеленые кристаллы, хорошо растворимые в этиловом спирте и плохо в воде; цвет спиртового раствора ярко-красный. Насыщенный раствор готовят растворением 10 г сухого основного фуксина в 100 мл этилового спирта. Из него готовят рабочий раствор в результате смешивания 10 мл со 100 мл воды.

*Фуксин карболовый (Циля)*. Для приготовления берут 10 мл насыщенного спиртового раствора основного фуксина и 100 мл 5%-ного водного раствора фенола.

Водный раствор при постоянном взбалтывании постепенно приливают к первому, а не наоборот. После смешивания готовый раствор фильтруют через бумажный фильтр и хранят в тщательно упакованной бутылки из темного стекла.

Карболовый фуксин Циля можно приготовить и по следующему рецепту: 1г основного кристаллического фуксина, 5г кристаллического фенола, несколько капель глицерина, 10 мл этилового спирта, 100 мл воды. Сначала краски смешивают и растирают в ступке, добавляя по каплям глицерин. Затем, при постоянном перемешивании, по каплям добавляют спирт, постепенно увеличивая порции, а после этого, начиная с малых порций, добавляют воду. Приготовленный в ступке раствор выдерживают 46 ч в термостате при 37°C для полного растворения фуксина, после чего фильтруют через бумажный фильтр. Краска довольно стойкая и может храниться длительное время. Она употребляется при работе с трудноокрашиваемыми объектами – кислотоустойчивые и спорообразующие бактерии.

*Раствор Люголя*. Основная составная часть данного раствора – кристаллический иод. Для его приготовления берут 1 г кристаллического йода и 2 г йодистого калия, растворяют в 300 мл дистиллированной воды. Йод плохо растворяется в воде, поэтому необходимо сначала в 5–10 мл воды растворить йодистый калий, затем прибавить кристаллический йод и только после полного растворения йода добавить дистиллированную воду, доводя объем до 300 мл.

Раствор фильтруют и хранят в темной склянке в прохладном месте. Применяется для окраски бактерий по Граму.

*Метиленовый синий (раствор Лёффлера)* – мелкие зеленые кристаллы с металлическим блеском, хорошо растворимые в спирте и воде; цвет раствора синий. К 30 мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего (7 г на 100 мл спирта) добавляют 100 мл дистиллированной воды и 1 мл 1%-ного водного раствора едкого кали (или едкого натра). Раствор краски может долго храниться; по истечении некоторого времени красит лучше, чем свежеприготовленный. Используется в методике окраски спор.

*Генциановый фиолетовый карболовый.* 1 г генцианового фиолетового растворяют в 10 мл спирта, полученный раствор смешивают со 100 мл 5%-ного водного свежеприготовленного раствора фенола. Для устранения образования осадка на препарате к раствору приливают еще несколько капель спирта до исчезновения с поверхности металлически блестящей зеленоватой пленки. Применяется в методике окраски по Граму.

*Кристаллический фиолетовый.* 20 мг кристаллического фиолетового растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Применяют при окраске бактерий по Граму.

## Приложение 5

### Средства для мытья лабораторной посуды

*Хромовая смесь № 1.* В концентрированную серную кислоту добавляют около 5% (от объема серной кислоты) размельченного в порошок кристаллического двуххромовокислого калия ( $K_2Cr_2O_7$ ) и осторожно нагревают в фарфоровой чашке на водяной бане до его растворения.

*Хромовая смесь № 2.* Двуххромовокислый калий растворяют в воде, затем в раствор осторожно добавляют серную кислоту. Смесь готовят из расчета: вода – 100 мл, двуххромовокислый калий – 6 г, серная кислота (плотность 1,84) – 100 мл.

После многократного употребления темно-оранжевый цвет хромовой смеси меняется на темно-зеленый. Такая смесь не обладает моющими свойствами. Хромовой смесью не следует мыть посуду, загрязненную углеводородами.

Хромовая смесь сильно разрушает ткани животного и растительного происхождения, поэтому работать с ней следует осторожно. Если она попала на руки или одежду, то пораженное место немедленно обмывают большим коли-

чеством воды, затем разбавленным раствором аммиака или соды, а затем снова водой.

*Спиртовой раствор КОН* – эффективное моющее средство. Его готовят растворением 40–50 г КОН в 500 мл воды. После остывания к раствору добавляют спирт-сырец в таком количестве, чтобы общий объем составил 1000 мл.

## Приложение 6

### Средства для обработки рабочего стола

*Водный раствор хлорамина.* Для приготовления одного литра 3%-ного водного раствора хлорамина в одном литре водопроводной воды вносят 30 г хлорамина и перемешивают жидкость до полного растворения препарата.

*Водный раствор лизола* (препарат фенола с добавлением зеленого мыла). Для приготовления одного литра 3%-ного раствора лизола смешивают 30 г лизола и 970 мл воды.

При работе с анаэробными микроорганизмами для обработки рабочих поверхностей используют стандартный 3%-ный раствор перекиси водорода.

## Приложение 7

### Обработка предметных стекол

Стекла кипятят в течение 10 мин в растворе следующего состава: биохромат калия – 20 г, дистиллированная вода – 200 мл, концентрированная серная кислота – 20 мл. Затем промывают в течение 5 мин слабым раствором едкого натра, далее проточной водопроводной водой. Погружают в дистиллированную воду на 12 ч. Высушивают в вертикальном положении.

С целью долгосрочного хранения стекла помещают в банку с притертой пробкой, содержащую смесь Никифорова (смесь (1:1) этилового эфира и этилового спирта). Перед работой стекла извлекают пинцетом и протирают чистой сухой полотняной салфеткой. На стеклах не должно быть пятен от пальцев. Подготовленные стекла можно хранить неопределенно долгое время, сложив в пакеты по 10–20 штук и завернув в бумагу.

При отсутствии заранее приготовленных обезжиренных стекол их можно быстро подготовить, натирая в сухом виде хозяйственным мылом и затем очищая чистой хлопчатобумажной тканью.

## Методические инструкции по подготовке исследовательского отчета по лабораторной работе

Лабораторная работа должна иметь вид законченного научного эксперимента и оформляться в виде исследовательского отчёта. Отчет по конкретной лабораторной работе должен содержать соответствующие разделы.

*Титульный лист:* ведомственная принадлежность, название работы, список исполнителей, место и дата проведения.

*Оглавление:* с перечнем нижеприведенных глав и разделов, указанием номеров страниц.

*Введение:* раскрывает основное содержание работы, суть используемых методов и их возможности, обоснование научной проблемы, на решение которой направлена данная работа.

*Объект:* указываются выбранный для эксперимента объект (объекты), схема отбора проб или схема постановки эксперимента.

*Оборудование и реактивы:* указываются список приборов и аналитического оборудования, перечень реактивов (с расчётом концентраций, ходом приготовления).

*Общие требования безопасности при выполнении работы:* указывается, с какими реагентами, какой лабораторной посудой и на каких этапах эксперимента следует проявлять особую осторожность и внимательность.

*Ход работы:* указываются способ подготовки проб к анализу (измерению), последовательность действий при выполнении анализа.

Вышеуказанные разделы готовятся студентами до начала лабораторной работы (т. е. входят в перечень заданий для самостоятельной работы, см. ниже) и сдаются преподавателю перед началом лабораторной работы.

Приведенные ниже разделы отчёта оформляются студентами после проведения лабораторной работы и сдаются преподавателю в печатном виде.

*Результаты:* в табличной форме приводятся экспериментальные данные с расчётом необходимых статистических показателей (диапазон измерений, точность, погрешности, характер распределения) в зависимости от типа эксперимента и использованного оборудования.

*Обсуждение:* проводится интерпретация экспериментальных данных, анализируются сведения из научной литературы, теоретические данные по проблеме исследования.

*Заключение:* обобщение полученных результатов.

*Литература:* приводится список литературы, использованной при выполнении лабораторной работы, в ходе обработки и интерпретации результатов.

## Для заметок

---

## Для заметок

---

## Для заметок

---

*Учебное издание*

Составители:

**Елькин** Андрей Анатольевич

**Ушаков** Вадим Юрьевич

**Нестерова** Лариса Юрьевна

**Микробиология и вирусология.  
Рабочая тетрадь для лабораторно-практических занятий**

Учебно-методическое пособие

Редактор *Н. И. Стрекаловская*

Корректор *Н. И. Цветкова*

Компьютерная верстка: *Е. А. Шкураток*

---

Объем данных 1,38 Мб

Подписано к использованию 10.09.2024

---

Размещено в открытом доступе

на сайте [www.psu.ru](http://www.psu.ru)

в разделе НАУКА / Электронные публикации  
и в электронной мультимедийной библиотеке ELiS

Управление издательской деятельности  
Пермского государственного  
национального исследовательского университета  
614068, г. Пермь, ул. Букирева, 15