

ЧАСТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СТАВРОПОЛЬСКИЙ МНОГОПРОФИЛЬНЫЙ КОЛЛЕДЖ»

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

к практическим занятиям и практической подготовке
по дисциплине «Основы микробиологии и иммунологии»
для обучающихся по специальности
34.02.01 Сестринское дело

Ставрополь, 2023 г.

сведения о сертификате ЭЦ

Владелец: Кандаурова Наталья
Владимировна, директор
Сертификат:
0298d2a100a6b37d85433743564d5a7918
Действителен: с 01.12.2025 12:39:11 по
01.03.2027 12:49:11

Методические указания составлены в соответствии с Федеральным Государственным образовательным стандартом среднего профессионального образования по специальности 34.02.01 «Сестринское дело» утвержденным Минобрнауки России от 12 мая 2014 г. N 502 и программой дисциплины «Основы микробиологии и иммунологии».

Составитель: Лушай А.Б.

Рассмотрено на заседании методического объединения укрупненных групп специальностей 34.00.00 Сестринское дело, 31.00.00 «Клиническая медицина»; протокол № 3 от «26» января 2023 г.

Рекомендовано к использованию в учебном процессе Методическим советом СмК, протокол № 4 от «27» января 2023 г.

Содержание

Введение	4
ПЗ 1. Правила техники безопасности при работе в микробиологических лабораториях. Часть 1	6
ПЗ 2. Правила техники безопасности при работе в микробиологических лабораториях. Часть 2	6
ПЗ 3. Правила работы в микробиологических лабораториях. Часть 1	9
ПЗ 4. Правила работы в микробиологических лабораториях. Часть 2	9
ПРП 1. Микроскопирование микробиологических препаратов. Препараты живых микроорганизмов.	11
ПРП 2. Окрашенные и фиксированные препараты микроорганизмов.	14
ПРП 3. Количественный учет микроорганизмов.	17
ПРП 4. Приготовление питательных сред и оборудования, их стерилизация.	20
ПРП 5. Получение накопительных культур микроорганизмов	25
Список рекомендуемой литературы	30

ВВЕДЕНИЕ

Цели освоения дисциплины:

Дать знания об основах микробиологии, иммунологии; научить дифференцировать разные группы микроорганизмов по их основным свойствам, осуществлять профилактику распространения инфекции.

В результате освоения дисциплины обучающийся должен

Знать:

- роль микроорганизмов в жизни человека и общества;
- морфологию, физиологию и экологию микроорганизмов, методы их изучения;
- основные методы асептики и антисептики;
- основы эпидемиологии инфекционных болезней, пути заражения, локализацию микроорганизмов в организме человека, основы химиотерапии и химиопрофилактики инфекционных заболеваний;
- факторы иммунитета, его значение для человека и общества, принципы иммунопрофилактики и иммунотерапии болезней человека, применение иммунологических реакций в медицинской практике;

Уметь:

- проводить забор, транспортировку и хранение материала для микробиологических исследований;
- проводить простейшие микробиологические исследования;
- дифференцировать разные группы микроорганизмов по их основным свойствам;
- осуществлять профилактику распространения инфекции;
- проводить простейшие микробиологические исследования;
- дифференцировать разные группы микроорганизмов по их основным свойствам;
- осуществлять профилактику распространения инфекции;

Процесс изучения дисциплины направлен на формирование следующих компетенций в соответствии с ФГОС СПО по данной специальности, а также личностных результатов:

ОК1 Выбирать способы решения задач профессиональной деятельности применительно к различным контекстам;

ОК2 Использовать современные средства поиска, анализа и интерпретации информации и информационные технологии для выполнения задач профессиональной деятельности;

ОК3 Планировать и реализовывать собственное профессиональное и личностное развитие, предпринимательскую деятельность в профессиональной сфере, использовать знания по финансовой грамотности в различных жизненных ситуациях;

ОК7 Содействовать сохранению окружающей среды, ресурсосбережению, применять знания об изменении климата, принципы бережливого производства, эффективно действовать в чрезвычайных ситуациях;

ПК3.1 Консультировать население по вопросам профилактики заболеваний.ПК2.1 Представлять информацию в понятном для пациента виде, объяснять ему суть вмешательств.

ПК3.2 Пропагандировать здоровый образ жизни.

ПК3.3 Участвовать в проведении профилактических осмотров и диспансеризации населения.

ПК3.4 Проводить санитарно-противоэпидемические мероприятия по профилактике инфекционных заболеваний.

ПК3.5 Участвовать в иммунопрофилактике инфекционных заболеваний.

ПК4.2 Выполнять медицинские манипуляции при оказании медицинской помощи пациенту.

Личностные результаты

реализации программы воспитания

ЛР13 Непрерывно совершенствующий профессиональные навыки через дополнительное профессиональное образование (программы повышения квалификации и программы профессиональной переподготовки), наставничество, а также стажировки, использование дистанционных образовательных технологий (образовательный портал и вебинары), тренинги в симуляционных центрах, участие в конгрессных мероприятиях

ЛР14 Соблюдающий врачебную тайну, принципы медицинской этики в работе с пациентами, их законными представителями и коллегами

ЛР15 Соблюдающий программы государственных гарантий бесплатного оказания гражданам медицинской помощи, нормативные правовые акты в

сфере охраны здоровья граждан, регулирующие медицинскую деятельность

**Личностные результаты
реализации программы воспитания, определенные ключевыми
работодателями**

ЛР18 Поддерживающий и проявляющий принципы

гуманности и милосердия.

**Личностные результаты
реализации программы воспитания, определенные субъектами
образовательного процесса**

ЛР 22 Выработавший принципы экологически

целесообразного поведения, бережного отношения к своей
жизни, жизни других людей, природы, планеты в целом.

инского назначения в ходе лечебно-диагностического процесса

Практическое занятие № 1, 2. Часть 1,2

Правила техники безопасности при работе в микробиологических лабораториях

Теоретическая часть

Правила работы и техника безопасности в микробиологических лабораториях

1. Работа в лаборатории ведется исключительно в халатах и сменной обуви или бахилах.
2. Верхняя одежда и сумки не должны находиться в лаборатории.
3. Запрещается принимать пищу и пить воду в лаборатории.
4. Работу с биологическим материалом проводить только предварительно обработанным инструментом.
5. При случайном попадании биологического материала на стол, руки или другие поверхности необходимо сразу же оповестить об этом преподавателя и провести обработку загрязненной поверхности дезинфицирующим раствором.
6. После работы необходимо тщательно вымыть руки с использованием дезинфекционных средств.
7. Рабочее место следует поддерживать в чистоте, не загромождать его посудой и лишними вещами.
8. Студентам запрещается работать в лаборатории в отсутствие преподавателя или лаборанта, а также в неустановленное время без разрешения преподавателя.

9. К выполнению каждой лабораторной работы нужно приступать только после получения инструктажа по технике безопасности, ознакомления с методиками и разрешения преподавателя.
10. Лабораторную работу необходимо проводить в точном соответствии с описанием в методических указаниях.
11. Для проведения работы пользоваться только чистой, сухой лабораторной посудой; для отбора объемов реактивов нужно иметь мерную посуду (пипетки, бюретки, мензурку, мерный цилиндр или мерный стакан); нельзя выливать избыток налитого в пробирку реактива обратно в емкость.
12. Если в ходе опыта требуется нагревание, надо следовать предусмотренным методическими указаниями способам нагрева: на водяной бане, на электроплитке или на спиртовке.
13. Нагревание предметного стекла в пламени спиртовки при приготовлении некоторых препаратов следует проводить равномерно.
14. Запрещается работать с неисправными электроприборами. О любых неисправностях следует незамедлительно информировать преподавателя.
15. По окончании работы следует привести в порядок свое рабочее место: помыть посуду, протереть поверхность рабочего лабораторного стола, закрыть водопроводные краны, выключить электрические приборы.

Правила работы и техника безопасности в бактериологических лабораториях

- В помещение разрешено входить только в халате и лабораторном головном уборе.
- В лабораторию нельзя вносить посторонние вещи, продукты.
- В помещении лаборатории категорически запрещается принимать пищу.
- Перед началом работы обязательно проверяют наличие и исправность приборов, посуды, горелок и др. О замеченных недостатках, неисправностях сообщают преподавателю или лаборанту.
- Запрещается зажигать одну горелку от другой.
- Нельзя касаться металлическими и другими предметами проводов и контактных частей электросети. Без разрешения преподавателя или лаборанта запрещено включать любую электроаппаратуру.
- Материал, используемый для учебных занятий, должен рассматриваться как особо опасный.

- При распаковке материала, присланного для исследования, необходимо соблюдать осторожность - банки с материалом снаружи обтирают ватой, смоченной дезинфицирующим раствором, и ставят только на подносы или кюветы.
- При исследовании поступившего материала и работе с бактериологическими культурами придерживаются общепринятых в микробиологической практике правил, исключающих возможность инфицирования работника.
- При работе с жидким инфицированным материалом используют резиновые баллоны, соединенные с пипеткой.
- Жидкости, содержащие патогенные микроорганизмы, переливают над сосудом с дезинфицирующим раствором.
- Если патологический материал случайно попал на стол, его немедленно удаляют тампоном, смоченным дезинфицирующим раствором. При попадании зараженного материала на кожу, конъюнктиву, слизистую оболочку ротовой полости принимают экстренные меры к обеззараживанию.
- По окончании работы патологический материал, использованные культуры микроорганизмов, инструменты и поверхность стола обеззараживают. В конце занятия бактериальные культуры и другой материал студенты сдают преподавателю, а рабочее место приводят в порядок.
- Перед уходом из лаборатории необходимо снять халат, вымыть руки и обработать их спиртом.
- После прохождения инструктажа о правилах работы в микробиологической лаборатории нужно расписаться в журнале по технике безопасности.

Вопросы к практическому занятию

1. Каковы основные задачи микробиологии
2. Назовите разделы частной микробиологии
3. Назовите этапы развития микробиологии
4. Назовите помещения микробиологической лаборатории
5. Каковы методы микробиологического исследования
6. Что является материалом для исследований
7. Что забирается для исследования от человека
8. Какие правила техники безопасности должен соблюдать лаборант
9. Каков порядок бактериологического исследования крови
10. Как производить забор испражнений для бактериологического исследования
11. Каковы правила сбора и транспортировки проб

Практическое занятие 3, 4. Часть 1,2

Правила работы в микробиологических лабораториях

Теоретическая часть

Стерильность – первое и основное условие работы в микробиологических лабораториях. Существует огромное количество способов эту стерильность обеспечить – более подробно о способах стерилизации объектов написано далее.

1. Стерильность лаборатории в целом обеспечивается надеванием халатов, сменной обуви/бахил, регулярной уборкой, облучением помещений и обработкой всех поверхностей дезинфицирующими средствами.
2. Стерильность на рабочем месте обеспечивается работой в ламинарных боксах, в которых производится фильтрация входящего воздуха ламинарными (без завихрений) потоками воздуха внутри рабочей зоны. Перед началом работы должна проводиться обработка бокса УФ-излучением в течение 15–30 мин, затем – обработка поверхностей 70 % этанолом. Один раз в месяц следует разбирать съемные детали, мыть бокс изнутри и также обрабатывать его 70 % этанолом. Также в зависимости от интенсивности работы один раз в 3–6 месяцев необходимо проводить дезинфекцию фильтров парами формальдегида.
3. Стерильность рабочего пространства вне ламинарного бокса обеспечивается обработкой дезинфицирующими растворами рабочих поверхностей и работой газовых горелок/спиртовок. 15-сантиметровая (в среднем) зона вокруг пламени спиртовки является стерильной, и именно в ней необходимо проводить все работы.
4. Стерильность рабочего инструмента (микробиологических игл и петель) обеспечивается их прокаливанием в пламени спиртовки / газовой горелки. Также в пламени горелки обжигаются горлышки пробирок и колб до и после работы с ними.
5. Стерильность сред, остального инструмента и посуды обеспечивается их автоклавированием или обработкой сухим жаром.
6. Отбор микроорганизмов проводится по следующему алгоритму:
 - Тремя пальцами правой руки (большим, указательным, средним) взять микробиологическую петлю и прокалить ее докрасна в пламени спиртовки.
 - Пробирку с культурой взять в левую руку и, не выпуская петли оставшимися пальцами правой руки (безымянным и мизинцем), вынуть пробку из пробирки и держать ее двумя пальцами во время всех дальнейших манипуляций. Ни в коем случае не следует касаться пробкой каких-либо предметов и уж тем более класть на стол!

- Одновременно с выниманием пробки следует обжечь горлышко пробирки/колбы во избежание ее загрязнения посторонней микрофлорой. Нужно помнить, что все работы должны проводиться в непосредственной близости от пламени спиртовки.
- Охладить петлю о внутренние стенки пробирки и отобрать из пробирки небольшое количество микроорганизмов, аккуратно извлечь петлю из пробирки.
- Вновь обжечь горлышко пробирки и закрыть ее пробкой.
- Проводить дальнейшие манипуляции с микроорганизмами.
- После проведения всех операций прокалить петлю.

Вопросы к практическому занятию

1. Дайте понятие стерилизации
2. Назовите методы стерилизации
3. Назовите режимы стерилизации
4. Изучите документы, регламентирующие способы стерилизации
5. Расскажите о следующих способах стерилизации:
 - Паровой метод стерилизации
 - Воздушный метод стерилизации
 - Газовый метод стерилизации
6. Как проводится контроль качества стерилизации: физический, бактериологический, химический (укажите индикаторы стерильности)
7. Изучите и законспектируйте представленный теоретический материал

Стерилизация различных объектов терапевтического отделения

Нельзя стерилизовать хлопчатобумажные, синтетические ткани и резиновые изделия.

Шпатели металлические

■ Кипячение в дистиллированной воде – 30 мин или обработка сухим воздухом при температуре 120⁰С в течение 45 мин. (в режиме дезинфекции).

■ Обработка сухим воздухом при температуре 4 – 180⁰С – 60 минут.

Ножницы

■ Кипячение в дистиллированной воде – 30 мин или в 2% содовом растворе – 15 мин. при полном погружении.

Мочалки для мытья пациентов

■ Кипячение в дистиллированной воде – 30 минут

■ Просушить.

Индивидуальная мочалка, мыло

Наконечники клизменные, катетеры

■ 3% раствор хлорамина – 60 мин.

■ 0,5% моющий раствор при температуре 45⁰С – 15 мин, или кипячение в 2% содовом р-ре – 15 минут с последующей мойкой.

■ Автоклавирование.

Мензурки

■ 1% р-р хлорамина – 60 мин., ополаскивание, или кипячение – 30 мин.

Перчатки

■ 3% р-р хлорамина – 60 мин или другой регламентированный дезраствор, полное погружение.

■ 0,5% моющий раствор – 15 мин.

■ Автоклавирование, щадящий режим.

Пипетки глазные

■ Кипячение в дистиллированной воде – 30 мин, стерилизация в щадящем режиме автоклава в разобранном виде.

Практическая подготовка 1

Микроскопирование микробиологических препаратов.

Препараты живых микроорганизмов

Алгоритм выполнения действий

1. Перед выполнением заданий ознакомьтесь с теоретическим материалом

Микроскопия до сих пор остается основным методом изучения микроорганизмов. Развиваясь, человечество предлагало все больше разнообразных способов модернизации как световой, так и электронной микроскопии. Некоторые из этих методов, наиболее часто использующихся в микробиологии, будут рассмотрены далее.

Метод светлого поля в проходящем свете – классический метод микроскопии, применяется для изучения объектов с неравномерной поглощающей способностью. Метод неэффективен, если объект прозрачен.

Метод темного поля в проходящем свете используется для изучения прозрачных и живых объектов. Свет в данном случае подается косыми лучами, поэтому фон у получаемого изображения темный. Попадая на объект, косые лучи преломляются, изменяют свою траекторию и попадают в объектив. Таким образом, объекты фактически светятся на темном фоне. Особенно удобно использовать этот метод для изучения микроорганизмов с естественной окраской.

Метод фазово-контрастной микроскопии также используется для изучения прозрачных объектов. При прохождении света через прозрачный объект не изменяются его интенсивность и длина волны, но изменяется фаза. Однако человеческий глаз не способен это изменение уловить. Для работы методом фазового контраста необходимо модифицировать микроскоп и добавить фазовую пластинку в объектив и кольцевую диафрагму под конденсор.

С помощью этих модификаций изменение фазы световой волны преобразуется в изменение амплитуды (яркости), что повышает контрастность объекта. Данный метод не

увеличивает разрешающую способность микроскопа, но позволяет изучать прозрачные объекты.

В методе люминесцентной микроскопии используется способность некоторых молекул светиться при воздействии на них света определенной длины волны. Изначально использовалась естественная биолюминесценция – многие вещества живых организмов способны светиться сами по себе (хлорофилл и другие пигменты, порфирины).

Следующий этап – обработка биообъектов флуорохромами.

Флуорохромы – красители, не вызывающие сильной окраски объектов в обычном свете, но флуоресцирующие при облучении ультрафиолетовыми/синими/фиолетовыми лучами. Из флуорохромов в микробиологии используют акридин оранжевый, корифосфин, примулин, родамин и др. Например, акридин оранжевый, проникнув в клетку, связывается с нуклеиновыми кислотами. Под действием ультрафиолетового излучения акридиновый оранжевый окрашивает РНК в оранжевый цвет, ДНК – в зеленый.

С развитием иммунологии появилась возможность присоединять флуорохромные маркеры к антителам. Антигены, обработанные иммунными сыворотками с антителами, мечеными флуорохромами, способны светиться в ультрафиолете люминесцентного микроскопа. Таким образом, появилась возможность «подсвечивать» отдельные молекулы.

Изменения также касаются и устройства микроскопа. Вместо обычных источников света используются ртутно-кварцевые или галогено-кварцевые лампы, испускающие ультрафиолетовые лучи.

На пути пучка света устанавливаются светофильтры, ограничивающие свет ненужных длин волн. Этот тип микроскопии за счет свечения позволяет увидеть объекты, величиной меньшие, чем разрешающая способность микроскопа.

Препараты живых микроорганизмов:

– Препарат «раздавленная капля» – наиболее стандартный для изучения микроорганизмов в микробиологии. Суспензия микроорганизмов при этом находится под покровным стеклом.

– Препарат «висячая капля» используется для наблюдения процессов в микробиологии – движения и деления. Микроорганизмы в данном препарате находятся в своих естественных условиях.

– Препарат «отпечаток» изготавливается путем прикладывания предметного стекла к верхней части колонии (например, для исследования спороношения стрептомицетов) или к ткани, пищевым продуктам, кожным покровам или слизистым.

– Препарат «микрокультура» создается методом выращивания микроорганизмов сразу на предметном стекле, предварительно покрытом агаризованной питательной средой. Это позволяет наблюдать непосредственно за развитием колонии, ее структурой и расположением клеток.

Цели работы: сформировать представление о методах микроскопии и живых препаратах микроорганизмов; вспомнить правила работы с микроскопами; обнаружить бактерии различных морфотипов в готовых фиксированных препаратах и приготовленных живых.

Оборудование и реактивы

1. Микроскоп, иммерсионное масло.
2. Предметные и покровные стекла, штатив к ним.
3. Спиртовки и зажигалки.
4. Микробиологические петли.
5. Фильтровальная бумага и вата.
6. Источник микроорганизмов – молочные продукты, вода из водоемов, рассолы, протухшее мясо, пиво.
7. Готовые фиксированные препараты различного происхождения.
8. Стекла с лункой для препаратов «висячая капля».

Задание 1. Микроскопирование готовых фиксированных препаратов

Студенту предлагаются готовые препараты чистых микробиологических культур с бактериями различных морфотипов. Основная задача данного этапа – оценить размеры бактерий, пронаблюдать и описать (зарисовать) различные их морфотипы. В качестве примеров могут служить фиксированные препараты из медицинской практики и препараты естественных источников микроорганизмов – пива, кефира, рассолов.

Задание 2. Приготовление препарата «раздавленная капля»

В асептических условиях с помощью микробиологической петли нанести на предметное стекло каплю воды. Затем с помощью микробиологической петли внести культуру микроорганизмов в каплю. В случае работы с жидкими культурами можно наносить на стекло каплю культуры. Воды и культуры нужно добавлять не более необходимого, то есть столько, чтобы после накрывания покровным стеклом жидкость не выступала за его края (в случае обратного – аккуратно убрать излишки фильтровальной бумагой). Клеток микроорганизмов не должно быть слишком много, они не должны заслонять друг друга, иначе препарат придется переделывать. Покровное стекло следует подвести к капле ребром и, постепенно наклоняя, аккуратно опустить на каплю, стараясь не допускать

образования пузырей воздуха. Микроскопировать полученный препарат с помощью «сухих» объективов, то есть без иммерсии. Отметить подвижность и форму клеток

Задание 3. Приготовление препарата «висячая капля»

Смазать вазелином края и дно лунки на специальном предметном стекле с углублением. В асептических условиях микробиологической петлей отобрать суспензию микроорганизмов из пробирки с протухшим мясом. Нанести каплю на покровное стекло. Аккуратно перевернуть покровное стекло каплей вниз и поместить на предметное стекло с лункой таким образом, чтобы капля не касалась ни стенок, ни дна лунки, а висела свободно. Пронаблюдать движение микроорганизмов, отметить разницу между двумя типами препаратов – висячей и раздавленной капли. Рассмотреть и отметить морфологическое строение исследуемых культур. В рабочей тетради написать отчет о проделанной работе, в нем описать препараты живых микроорганизмов, которые наблюдали, зарисовать форму микроорганизмов и процедуру приготовления препарата «висячая капля».

Практическая подготовка 2

Окрашенные и фиксированные препараты микроорганизмов

Алгоритм выполнения действий

1. Перед выполнением заданий ознакомьтесь с теоретическим материалом

Большинство клеток микроорганизмов в естественных условиях не окрашены и поэтому плохо видны в световой микроскоп, с трудом поддаются изучению. В связи с этим Р. Кох первым стал пробовать окрашивать микроорганизмы для их изучения. В настоящее время можно выделить следующие виды окраски: – Окраска прижизненная (витальная). Для нее используют только витальные красители, не вызывающие гибель клеток. Таковыми являются, например, водные растворы в концентрации 0,2–0,001 % метиленового синего, конго красного. – Окраска фиксированных препаратов. В отличие от «живых» препаратов, фиксированные нет смысла изучать без окраски. Фиксация включает в себя и «убийство» клеток, поэтому возможности для применения различных окрасок не ограничены. Приготовление фиксированного препарата проходит в несколько стадий: приготовление мазка, высушивание мазка, фиксация мазка в пламени горелки либо в специальных фиксирующих жидкостях, окраска. Фиксация препаратов имеет несколько целей: во-первых, как уже говорилось выше, это «убийство» микроорганизмов, во-вторых,

обеспечение лучшего прилипания клеток к стеклу, а в-третьих, увеличение восприимчивости клеток к окраске за счет (опять же) их «убийства», так как мертвые клетки окрашиваются лучше живых. Также для рассмотрения фиксированных препаратов можно использовать иммерсию и иммерсионный объектив. Кроме этого, окраску подразделяют на следующие виды:

– Простая, проходящая в одну стадию с использованием одного красителя; в качестве красителей обычно используют метиленовый синий, водный раствор фуксина, водный раствор сафранина.

– Сложная, когда окраска производится минимум двумя красителями с этапом отмывки между ними. Классический пример сложной окраски – окраска по Граму (с использованием трех красителей), другой пример, использующийся в медицинской практике, – окраска по Цилю – Нельсону.

– Дифференцированная, при которой прокрашиваются определенные части микроорганизмов – капсула, нуклеоид, включения, жгутики и т. д. В рамках данной лабораторной работы необходимо ознакомиться с методом окраски живых препаратов дрожжей раствором Люголя для выявления включений, окраской методом негативного контрастирования живых препаратов клеток, содержащих капсулу, а также со способом приготовления фиксированного окрашенного препарата.

Включения – довольно обширное понятие, под которым объединяются все везикулы, существующие в бактериальных клетках. Они могут содержать в себе питательные вещества – полисахариды, полифосфаты, липиды, серу. Помимо запасающей функции, включения могут регулировать осмотическое давление клетки. Кроме того, везикулы могут содержать фотосинтетические пигменты зеленых бактерий (хлоросомы) и цианобактерий (фикобилисомы). Некоторые водные микроорганизмы имеют газовые вакуоли. Окрашиваются включения опять-таки в зависимости от их содержимого – это раствор Люголя для полисахаридов, судан III либо судан черный для липидных гранул, метиленовый синий для полифосфатов (волютин).

Капсулы – структура, вырабатываемая бактериями на поверхности клеток. Она служит еще одним защитным слоем как от физических, так и от иммунологических воздействий. По природе своей гидрофильна, состоит из большого количества воды, связанной с полисахаридами и полипептидами. Капсула вследствие своих свойств практически не окрашивается. Окраску капсул можно провести методами негативного окрашивания с помощью туши – методами окраски мазка по Хиссу, Бурри – Гинсу или Дюгиду. Также существуют методы окраски по Романовскому – Гимзе и Михину с использованием красящих веществ.

Цель работы: изучить методы окраски микроорганизмов и способы приготовления фиксированного окрашенного препарата.

Оборудование и реактивы

1. Микроскоп, иммерсионное масло.
2. Предметные стекла, штатив к ним.
3. Спиртовки и зажигалки.
4. Микробиологические петли.
5. Фильтровальная бумага, вата, хозяйственное мыло.
6. Чистые культуры микроорганизмов, в том числе образующих капсулу.
7. Суспензия пекарских дрожжей.
8. Красители: водный раствор сафранина, метиленовый синий, тушь, раствор Люголя.

Задание 1. Окраска включений

В асептических условиях внести на покровное стекло каплю культуры дрожжей. Внести в суспензию клеток каплю раствора Люголя. Накрыть препарат покровным стеклом и микроскопировать. Покровным стеклом нужно накрывать аккуратно, не допуская появления воздушных пузырей. Отметить окрашивание гликогеновых включений дрожжей, внести в рабочую тетрадь процесс приготовления препарата и получившийся результат.

Задание 2. Окраска капсул

Нанести на предметное стекло каплю туши; промыть и прожечь петлю. В асептических условиях внести в тушь каплю исследуемых микроорганизмов, имеющих капсулы. Распределить полученную смесь по стеклу петлей. Накрыть покровным стеклом. На темном фоне должны быть видны клетки, окруженные непрокрашенной капсулой. Внести в рабочую тетрадь процесс приготовления препарата и получившийся результат.

Задание 3. Фиксированный окрашенный препарат

Обезжирить чистое предметное стекло мылом. В асептических условиях нанести на него каплю воды, в которую петлей (также в асептических условиях) внести культуру бактерий (аналогично препарату «раздавленная капля»). Этой же петлей распределить полученную суспензию максимально тонким слоем по поверхности стекла. Высушить мазок, желательнее при комнатной температуре. Если все было сделано правильно на этапе приготовления мазка (то есть было нанесено небольшое количество воды и распределено тонким слоем), то высушивание происходит быстро. Зафиксировать мазок. Взять

предметное стекло двумя пальцами и, держа предметное стекло мазком вверх, провести его через верхнюю часть пламени спиртовки (наиболее горячую) три раза.

Важно! Проводить предметное стекло через пламя необходимо и не слишком быстро (в этом случае не произойдет фиксации), и не слишком медленно (в этом случае велик шанс деформировать клетки).

Поместить препарат в штатив для окрашивания и нанести на него краситель. Выдержать 1 мин. (время может варьироваться в зависимости от красителя). По истечению времени промывать препарат водой до тех пор, пока стекающая вода не обесцветится. Микроскопировать с объективом 100 × с использованием иммерсионного масла. Отметить морфологию исследуемых клеток, сравнить окрашенный фиксированный и препарат с прижизненной окраской. Внести в рабочую тетрадь процесс приготовления фиксированного окрашенного препарата. Подобная методика является базовой для приготовления наиболее распространенных сложных окрасок.

Практическая подготовка 3.

Количественный учет микроорганизмов

Алгоритм выполнения действий

1. Перед выполнением заданий ознакомьтесь с теоретическим материалом

Во многих сферах микробиологии количественный учет микроорганизмов не менее важен, чем качественный. Это касается как почвенной или водной микробиологии, так и медицинской. Во всех случаях необходимо оценить бактериальную нагрузку чего-либо микроорганизмами: в первом случае для того, чтобы сделать экологическое описание той или иной среды, а во втором – чтобы оценить степень заражения и назначить адекватную терапию.

Оценивать количество микроорганизмов можно различными способами: – прямым подсчетом различными методами (в камере Горяева, методом Виноградского – Брида, на мембранных фильтрах, капиллярным методом); – косвенными методами, основанными на разведении суспензии клеток и высевом их на питательные среды (методом Коха) и на расчете различных показателей, изменяющихся в зависимости от количества микроорганизмов (оптическая плотность в нефелометрическом методе). В данной работе необходимо будет проанализировать суспензию клеток дрожжей и сравнить четыре метода подсчета микроорганизмов – два прямых метода (в камере Горяева и методом

Виноградского – Брида) и два косвенных – метод Коха и нефелометрический метод. Обычно в исследуемой среде клеток слишком много и для прямых, и для косвенных методов подсчета микроорганизмов, поэтому ее разводят в несколько раз и работу ведут с серией разведений.

Прямые методы

Камера Горяева – особое предметное стекло с нанесенной на него микроскопической стеклой. Подсчет клеток в камере Горяева осуществляется в больших или малых квадратах сетки в зависимости от размеров микроорганизмов. Сетка нанесена на поверхность стекла, расположенного строго на 0,1 мм ниже, чем соседние площадки. Они используются для притирания специального толстого покровного стекла к камере. Образование радужных колец (колец Ньютона) в месте площадок говорит о том, что притирание прошло успешно и объем камеры соответствует заявленному.

Метод Виноградского – Брида заключается в подсчете микроорганизмов на фиксированных окрашенных мазках в полях зрения. Для этого на предметном стекле с помощью миллиметровой бумаги вычерчивают прямоугольник с определенной площадью и готовят фиксированный окрашенный мазок суспензии клеток известного объема по площади этого прямоугольника. Подсчет производят в полях зрения, предварительно высчитав их площадь (обычно с помощью объект-микрометра). Два этих метода являются прямыми методами подсчета. На каждое разведение необходимо подсчитать не менее 600 клеток. Метод подсчета клеток на мембранных фильтрах используется для количественного учета микроорганизмов с низкими плотностями клеток. Определенный объем пробы исследуемого субстрата отделяют через фильтры с определенным размером пор, а затем окрашивают и подсчитывают клетки с помощью микроскопа с окулярной сеткой.

Косвенные методы

Нефелометрический метод. Те же самые разведения, которые использовались при прямых методах подсчета, будут использованы для измерения оптической плотности с помощью фотоэлектроколориметра (ФЭК) и составления калибровочной кривой. Построение графика по соотношению данных прямого подсчета микроорганизмов с данными ФЭК позволяет получить формулу для перевода этих данных в количество микроорганизмов. В дальнейшем подобная формула позволяет существенно экономить время и исследовать культуры клеток только на ФЭК, минуя прямые методы подсчета.

Метод Коха основан на посеве определенного объема трех конечных разведений на три чашки Петри с питательной средой. В конечных разведениях клеток должно быть не очень много, чтобы каждая из них образовывала изолированную колонию, но и не очень

мало (если колоний на чашке Петри будет меньше десяти, то этот результат нельзя использовать для подсчета). Каждая изолированная колония – потомство одной клетки, что позволяет соотнести количество выросших колоний с количеством клеток. Для равномерного распределения клеток обычно используют шпатель Дригальского.

Цель работы: освоить различные методы количественной оценки микроорганизмов и возможности их сопоставления.

Оборудование и реактивы

1. Суспензия культуры дрожжей.
2. Пробирки для разведения культуры со стерильной водопроводной водой.
3. Чашки Петри со средой Сабуро для выращивания дрожжей.
4. Стерильные шпатели Дригальского, 3 шт. на группу.
5. Камеры Горяева.
6. Миллиметровая бумага, предметные стекла.
7. Спиртовки и зажигалки.
8. Микроскопы.
9. Объект-микрометр.
10. ФЭК, кюветы к нему, стерильная чистая среда для контроля.
11. Фильтровальная бумага, вата, хозяйственное мыло.
12. Самплеры и стерильные наконечники к ним.

Задания 1 и 2 данной работы выполняются единожды на всю группу и в ламинарном боксе.

Задание 1. Приготовление серии разведений исходной суспензии

Приготовить 7 пробирок с 5 мл стерильной воды в каждой. Подписать пробирки (1–7). В пробирку № 1 внести 5 мл исходной суспензии, перемешать самплером и сменить наконечник. В пробирку № 2 внести 5 мл из пробирки № 1, перемешать самплером и сменить наконечник. Каждый раз с помощью нового наконечника проделывать ту же процедуру с оставшимися пробирками.

Важно! Нельзя погружать кончик наконечника слишком сильно в раствор, откуда производится забор материала.

Задание 2. Посев на чашки Петри для подсчета методом Коха

В асептических условиях пипеткой внести 50 мкл суспензии из пробирки № 7 на чашку Петри, распределить по ней этот объем с помощью стерильного шпателя Дригальского. Подписать чашку Петри: видовое название, разведение, дата, группа. Повторить

процедуру с пробирками № 5 и 6. Сразу их подписать. Поставить чашки Петри в термостат на 37 °С. 32 Подсчитать количество выросших колоний на следующем занятии и вычислить количество клеток в исходной суспензии по формуле: $10^n \cdot a \cdot M \cdot V$ где М – число клеток в 1 мл суспензии; а – среднее число колоний, выросших после посева из данного разведения; V – объем суспензии, взятой для посева; 10^n – коэффициент разведения.

Задание 3. Подсчет клеток в камере Горяева

Притереть покровное стекло к предметному до появления радужных колец на местах притирки. Появление колец Ньютона означает, что объем камеры в таком положении точно равен заявленному. Внести каплю суспензии под покровное стекло капилляром или сэмплером. Микроскопировать с объективом $\times 40$ или $\times 20$. Подсчитывать все клетки микроорганизмов, находящиеся внутри большого квадрата, а также на пограничных линиях, если они большей частью находятся в данном квадрате. Клетки, большая часть которых находится в другом квадрате, не подсчитываются. Если клетки пересекаются пограничной линией пополам, то их считают только на двух смежных сторонах квадратов, например, на левой и нижней. Подсчитать необходимо не менее 600 клеток для каждого разведения. Для этого придется посмотреть и приготовить не один препарат. Всю информацию заносить в тетрадь. После подсчета около 600 клеток необходимо подсчитать среднее количество клеток в большом квадрате сетки и подставить результат в формулу подсчета общего количества клеток в 1 мл суспензии по формуле: $1000 \cdot a \cdot M \cdot n \cdot h \cdot S$ где М – число клеток в 1 мл суспензии; а – среднее число клеток в большом квадрате сетки; n – коэффициент разведения суспензии; h – глубина камеры; S – площадь квадрата сетки. Глубина камеры и площадь квадрата сетки (или объем камеры) указаны на самой камере. Не забыть также внести эти данные в тетрадь.

Практическая подготовка 4

Приготовление питательных сред и оборудования, их стерилизация

Алгоритм выполнения действий

1. Перед выполнением заданий ознакомьтесь с теоретическим материалом

Выращивание микроорганизмов – основа всей микробиологии, поэтому правильный подбор и подготовка среды – крайне важный навык. Существует несколько классификаций сред. 1. По консистенции: – Жидкие среды готовятся добавлением в воду (дистиллированную или водопроводную) различных органических и неорганических

веществ. Исторически такой тип сред был первым способом выращивания микроорганизмов. До сих пор жидкие среды используются во многих аспектах микробиологии.

– Полужидкие среды получают путем добавления в жидкую среду 0,5 % агара.

– Твердые питательные среды. Первым их начал применять в широкой практике Р. Кох. Твердые питательные среды получают путем добавления загустителей (уплотнителей) к жидким средам. В качестве загустителей служат агар-агар, желатин и силикагели. Агар – сложный полисахарид, состоящий из смеси агарозы и агаропектина и получаемый из бурых и красных водорослей. Вследствие некоторых своих особенностей он занял лидирующее положение среди остальных загустителей. К числу таких преимуществ можно отнести относительно высокую температуру плавления (95–100°C), неспособность большинства микроорганизмов использовать его в качестве питательного субстрата и относительную дешевизну. Агар добавляют в концентрации от 1,5 до 3 %. Желатин – продукт неполного гидролиза белка коллагена, выделяемого из кожи, костей и хрящей животных. Также используется в качестве загустителя, но гораздо реже по причинам низкой температуры плавления (25–30 °C) и большого количества микроорганизмов, обладающих протеолитической активностью и, соответственно, разлагающих желатин. Силикагель – неорганическое вещество, представляющее собой высушенные перенасыщенные растворы кремниевых кислот. Так как органических веществ этот загуститель не содержит, его используют преимущественно для выращивания хемолитоавтотрофов.

– Сыпучие питательные среды используются в микробиологической промышленности для хранения культур микроорганизмов. Чаще всего в качестве сыпучих сред выступают отруби или кварцевый песок, пропитанные раствором питательной среды.

2. По природе компонентов:

– Натуральные питательные среды состоят исключительно из продуктов естественного происхождения – крови, молока, овощных, дрожжевых или мясных отваров. Натуральные среды отличаются широким спектром веществ в своем составе, универсальностью, но у них есть существенные недостатки – невозможно точно установить их качественный или количественный состав. Таким образом, нельзя их использовать для изучения метаболизма микроорганизмов.

– Полусинтетические питательные среды получают добавлением различных синтетических компонентов к вышеперечисленным натуральным средам.

– Синтетические питательные среды состоят исключительно из точных навесок заранее известных и чистых органических и/или неорганических веществ. Состав подобных сред

всегда точно известен, их возможно использовать для изучения метаболизма. Кроме этого, некоторые микроорганизмы растут преимущественно именно на синтетических средах.

По назначению:

– Универсальные питательные среды используются для выращивания широкого спектра микроорганизмов. Если сам микроорганизм не требователен к составу питательных сред, то он стабильно будет расти на универсальных питательных средах. Подобные питательные среды чаще всего являются также натуральными по своему составу.

– Элективные питательные среды используются для выделения культур микроорганизмов из естественных ниш. Своим составом они благоприятствуют одним микроорганизмам и препятствуют росту других. Таковой средой является среда Эшби, используемая для выращивания азотфиксирующих бактерий. Так как сама среда не содержит в себе источника азота, то только бактерии, способные фиксировать его из атмосферы, способны расти на ней.

– Дифференциально-диагностические питательные среды используют в медицинской и санитарной микробиологии для видового/родового определения микроорганизмов среди узкого спектра патогенных, условно-патогенных и санитарно-показательных микроорганизмов. Дифференциация происходит на основе их метаболизма. Среда подбирается таким образом, чтобы при росте определенного микроорганизма изменялась рН и, соответственно, менялся цвет индикатора, добавленного в среду. Такой средой является, например, агар Клигlera, который способен дифференцировать пять видов различных микроорганизмов по их способности ферментировать глюкозу и лактозу, выделять газ и сероводород. Питательная среда должна содержать в себе источник энергии, источник углерода, источник азота, а также для некоторых бактерий факторы роста. Те бактерии, которые могут самостоятельно синтезировать все необходимое для собственного роста, называют прототрофами. Бактерии, требующие для своего существования определенных факторов роста, называют ауксотрофами. В качестве факторов роста могут выступать отдельные аминокислоты, витамины, пурины, пиримидины и др. Как уже описывалось ранее, в основе всей микробиологической практики находится стерильность условий работы.

Создание асептических условий – необходимое требование для правильной работы в микробиологических лабораториях.

Существует множество способов обеспечить подобные условия.

1. Термическая стерилизация (методы, основанные на высоких температурах):

– Фламбирование – обработка рабочего инструмента в пламени. Подобным образом обрабатываются микробиологические петли, иглы, шпатели, горлышки посуды

непосредственно перед работой. Фламбирование происходит в верхней, самой горячей части пламени. – Обработка сухим жаром (180 °С, 2 ч) в сухожаровых шкафах. Применяется для пустой стеклянной и фарфоровой посуды, термостойчивых порошков. – Автоклавирование – обработка насыщенным паром под давлением. Осуществляется в специальных приборах – автоклавах, в которых создается дополнительное давление, позволяющее проводить обработку паром температурой выше 100 °С. Чаще всего для стерилизации в микробиологической практике используют температуры от 112 до 135°С. Для этого в автоклавах создается дополнительное давление в 0,5–1,5 ати (атмосферы избытка). Автоклавированием стерилизуют в первую очередь микробиологические среды. Прежде чем стерилизовать колбы со средами, необходимо их 40 правильно упаковать – подобрать пробку, закрепить ее, подписать колбу. Количество среды в колбе не должно превышать треть ее объема. Таким образом, 100 мл среды следует стерилизовать в колбе объемом 250 мл.

– Тиндализация – особый способ температурной стерилизации сред и различных веществ, которые нельзя стерилизовать при температурах выше 100 °С. Тиндализацию осуществляют текучим паром в кипятыльниках Коха или в незакрытых автоклавах. Обработку проводят в течение 10–15 мин., после чего среды на сутки ставят в благоприятные условия – в термостат при 30 °С. В это время споры, которые выжили при обработке текучим паром, прорастают, становясь вегетативными клетками. Спустя сутки процедуру повторяют. Прделав весь цикл несколько раз, можно добиться полного исчезновения спор.

– Пастеризация – однократное нагревание объекта стерилизации до 60–70 °С в течение 10–15 мин. Подобный метод не позволяет избавиться от спор микроорганизмов и стерильности не обеспечивает. Пастеризацию используют в тех случаях, когда объект не выдерживает нагревания выше 70–80 °С. Чаще всего пастеризацию используют для вина, пива, молока и т. д. – Кипячение используется редко для стерилизации металлического и стеклянного инструмента в течение 30–40 мин.

Холодная стерилизация (без повышения температуры):

– Стерилизации химическими веществами чаще всего подвергаются поверхности, и реже – инструмент. В качестве дезинфицирующих средств может выступать множество соединений – хлорсодержащие, спирты, ПАВ, третичные амины, соединения серебра, перекисные соединения и многое другое. Для каждого дезинфицирующего средства есть свои режимы обработки и другие особенности.

– Стерилизации газообразными веществами подвергается лабораторная посуда, не выдерживающая высоких температур – вся посуда из термолабильного пластика,

например. Стерилизация осуществляется в специальных приборах, посуду также необходимо корректно упаковать. В качестве стерилизующих газов используют оксид этилена, формальдегид, озон.

– Стерилизации облучением подвергаются в первую очередь помещения, рабочее место (в ламинарном боксе) и поверхности. Стерилизацию проводят с помощью ультрафиолетового излучения, и реже – некоторых других его видов. – Стерилизация фильтрованием применяется для тех соединений, которые не выдерживают даже небольшого нагревания. В качестве бактериальных фильтров используют соединения с размерами пор не более 0,7 мкм. Особое распространение получили мембранные фильтры на основе нитроцеллюлозы.

Цель работы: изучить с теоретической и практической точек зрения подготовительный этап микробиологической работы – приготовление и стерилизацию питательных сред и оборудования, а также особенности культивирования микроорганизмов.

Оборудование и реактивы

1. Чашки Петри, пробирки, штативы к ним, шпатели.
2. Газеты/бумага для упаковки, ватные пробки.
3. Реактивы: Nutrient Broth (мясопептонный бульон), мочевины, сахароза, K_2HPO_4 , $MgSO_4$, $NaCl$, K_2SO_4 , $CaCO_3$, глюкоза, агар, сусло.
4. Весы, кисточки, шпатели.
5. Автоклав, сухожаровой шкаф.

Ход работы

1. На каждую бригаду упаковать четыре чашки Петри, шпатели для стерилизации.
2. На бригаду приготовить среды в зависимости от выбранного номера.
3. В рабочую тетрадь оформить отчет с краткой теорией, номером бригады, составом и количеством собранной среды (как в г/л, так и пересчитанной). Показать отчет преподавателю. Состав среды указан в граммах на литр, также указано, сколько пробирок/колб и какого объема необходимо приготовить. В первую очередь необходимо произвести расчет того, сколько, чего и в какой посуде необходимо приготовить. Нужно обратить внимание на то, что в большинстве случаев требуются как жидкие, так и твердые питательные среды. Указывается состав жидкой среды, для получения твердой среды необходимо добавить 2 % агара. Nutrient Broth – готовая коммерческая среда, представляющая собой высушенный мясопептонный бульон.

Бригада 1. Среда (г/л): Nutrient Broth – 13, мочеви́на – 100 (отсутствие в составе агара говорит о том, что среда эта жидкая!). Приготовить две пробирки по 5 мл жидкой среды в каждой. Среда (г/л): Nutrient Broth – 13, мочеви́на – 20, агар – 20. Приготовить колбу на 250 мл со 100 мл агаризованной среды. Приготовить две пробирки с 5 мл агаризованной среды в каждой. Колбы закрыть ватными пробками и упаковать в газету, пробирки также закрыть ватными пробками, поставить в штатив.

Бригада 2. Среда (г/л): сахароза – 20, K_2HPO_4 – 0,2, $MgSO_4$ – 0,2, NaCl – 0,2, K_2SO_4 – 0,1, $CaCO_3$ – 5,0, агар – 20,0. Приготовить две колбы на 250 мл со 100 мл и две пробирки с 5 мл среды. Упаковать две дополнительные чашки Петри. Колбы закрыть ватными пробками и упаковать в газету, пробирки поставить в штатив и также упаковать в газету.

Бригада 3. Среда: Nutrient Broth – 6,5 г в 500 мл воды смешать с 500 мл су́сла, агар – 20 г. Приготовить колбу на 250 мл со 100 мл среды и две пробирки с 5 мл среды в каждой. Колбы закрыть ватными пробками и упаковать в газету, пробирки также закрыть ватными пробками и поставить в штатив.

Практическая подготовка 5

Получение накопительных культур микроорганизмов

Накопительными называют культуры, в которых преобладает одна группа или даже один вид микроорганизма. Для получения накопительной культуры создают селективные условия, обеспечивающие преимущественное развитие лишь данной группы или данного вида микроорганизмов и неблагоприятные — для развития сопутствующих форм микробов.

Цель работы: получить накопительные культуры сенной (*Bacillus subtilis*) и картофельной (*Bacillus subtilis var mesentericus*) палочек.

Оборудование и материалы: чашки Петри, конические колбы, ножницы, мел, вата, фильтровальная бумага, электроплитка.

Объект исследования: сено, клубни картофеля.

Ход работы.

Получение культуры сенной палочки (*Bacillus subtilis*)

Сено из разнотравья мелко нарезают и помещают в колбу объемом 500 мл, заполняя ее на четверть объема, добавляют 100—150 мл воды и щепотку мела. Смесь кипятят 15—20 мин, пока среда не приобретет цвет настоя крепкого чая. Сенной отвар разливают в подготовленные конические колбы слоем 1—1,5 см, закрывают ватными пробками и

помещают в термостат при температуре 25 °С или вблизи радиатора центрального отопления.

Через двое суток на поверхности среды развивается беловатая пленка *Bacillus subtilis*, которая при старении на третьи-четвертые сутки становится серовато-зеленоватой.

Другие микроорганизмы при этом вырастают редко и в небольших количествах.

Получение культуры картофельной палочки (*Bacillus subtilis var mesentericus*)

Промытые клубни картофеля, не очищая, нарезают кружочками. Поверхность их натирают мелом для нейтрализации среды и помещают в чашки Петри на двойной слой фильтровальной бумаги, смоченной водой. Чашки ставят в термостат с температурой 27—30 °С на трое-четыре суток. На поверхности ломтиков картофеля образуется плотная морщинистая пленка культуры картофельной палочки. Окраска пленки может быть разной: беловато-серой, розовой, желто-бурой, черной, — что зависит от разновидностей культуры, получивших преимущественное развитие.

Задание. Отметить интенсивность развития культур микроорганизмов, просмотреть их под микроскопом и зарисовать.

Список рекомендуемой литературы

Основная литература

1. Васюкова, А.Т. Микробиология, физиология питания, санитария и гигиена: учебник / Москва: КноРус, 2019 (СПО). <https://book.ru/book/931487>

Дополнительная литература

1. Камышева Карина Сергеевна. Основы микробиологии и иммунологии. Учебное пособие для студентов СПО. Ростов н/Д: Феникс, 2019-381 с.