

Куб ГАУ

**кафедра микробиологии,
эпизоотологии и
вирусологии**

**Ведущий преподаватель
доктор биологических наук,
профессор**

Нино Нодариевна Гугушвили

Лабораторные занятия
по общей микробиологии
для факультета
ветеринарной медицины

Тема

Питательные среды. Методы культивирования микробов и аппаратура. Учет результатов анализа воздуха.

Задание

1. Ознакомиться с питательными средами и техникой их изготовления.
2. Ознакомиться с методами культивирования микробов и получения чистой микробной культуры.
3. Изучить методы стерилизации различных материалов по таблицам, зарисовать.
4. Произвести учет результатов микробиологического анализа воздуха по методу Коха (определить общее количество микробов в 1 м³). Отобрать одну колонию и сделать посев на МПБ, МПА (косячок) для получения чистой культуры.

1. Ознакомление с питательными средами и техникой их изготовления

Питательная среда – любой набор субстратов, удовлетворяющий потребности определенной группы микроорганизмов.

Культивирование микроорганизмов проводят с учетом их питательных потребностей в условиях доступа кислорода (аэробы) или его отсутствия (анаэробы).

Классификация питательных сред:

I. По происхождению:

1) естественные (почва, минеральные источники, торф, навоз, молоко и др.);

2) искусственные (мясопептонный агар (МПА), мясопептонный бульон (МПБ), сусло, сусло-агар (СА), среды Чапека, Виноградского, Эндо, Эшби и многие другие).

II. По физическому состоянию:

- 1) жидкие (молоко, МПБ);
- 2) плотные (почва, МПА, СА);
- 3) полужидкие (МПА и СА с добавлением 0,5-0,8% агар-агара вместо 1,5-2,0%);
- 4) сыпучие (увлажненное разваренное зерно ячменя, пшеницы и других культур).

III. По назначению:

- 1) обычные (стандартные – МПА и МПБ);
- 2) селективные (среда Виноградского для нитрификаторов, среда Эшби для азотфиксаторов);
- 3) дифференциально-диагностические (агар Эндо для бактерий группы кишечной палочки - БГКП)

Типы питания и получения энергии микроорганизмами

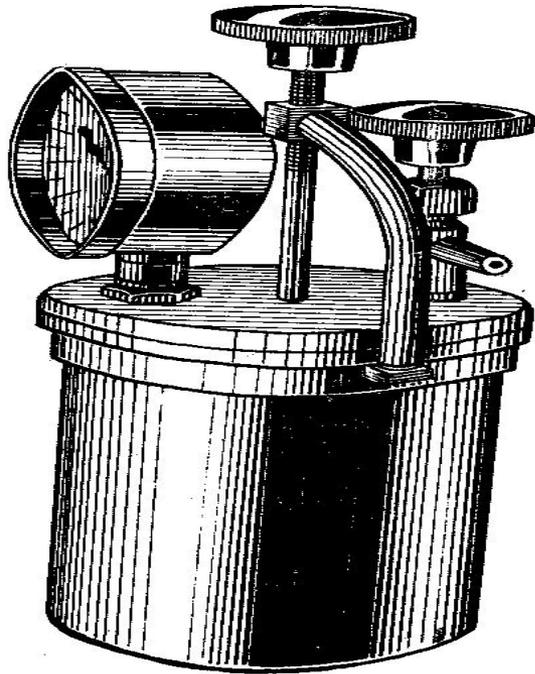
Источник энергии	Источник углерода	
	Углекислый газ	органическое вещество
свет	фотоавтотрофы	фотогетеротрофы
окисление органических веществ	Хемоорганов-автотрофы	Хемоорганогетеротрофы
окисление неорганических веществ	Хемолитов-автотрофы	Хемолитогетеротрофы

2. Ознакомление с методами культивирования микробов и получения чистой микробной культуры

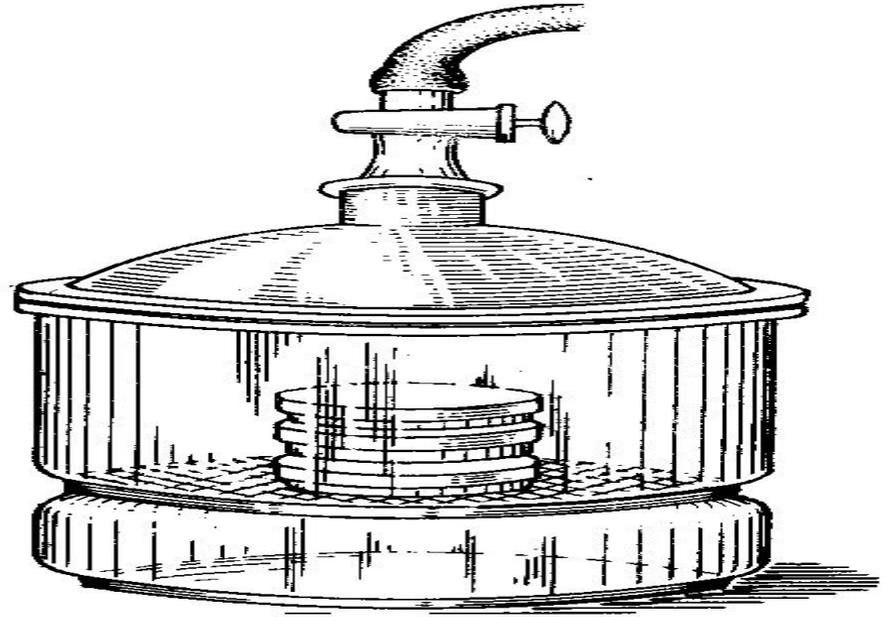
При культивировании анаэробов, развитие микробов проводят в стационарных условиях без перемешивания среды, для удаления растворенного кислорода среды нагревают и резко остужают перед посевом микроорганизмов, либо культуры выращивают в анаэроостатах под вакуумом или разряженным воздухом. При необходимости можно полностью изменить состав газовой фазы путем вытеснения воздуха инертными газами, N_2 , CO_2 . Температурный оптимум поддерживают с помощью термостатов, водяных бань.



Термостат для культивирования микроорганизмов

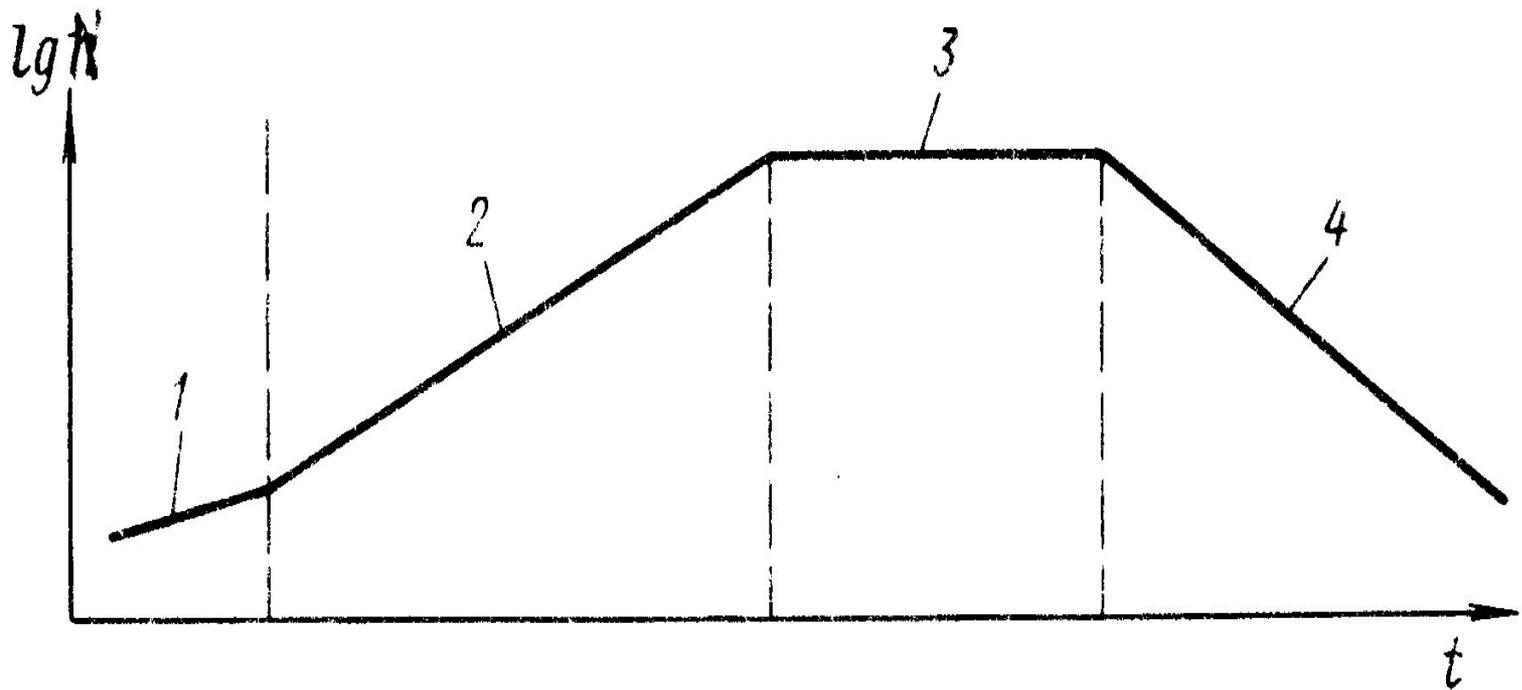


Микроанаэро-
стат



Стеклянный ва-
куумный эксикатор

**Микроанаэро-
стат и вакуумный
эксикатор для культивирования
анаэробных микроорганизмов**



Логарифмическая кривая роста численности микроорганизмов при периодическом культивировании.

1 – лаг-фаза, 2 – лог-фаза, 3 – стационарная фаза, 4 – фаза отмирания.

На графике по оси ординат отложен десятичный логарифм плотности клеток (численности микроорганизмов в единице объема питательной среды) N , по оси абсцисс – время культивирования клеток t , выраженное, как правило, в часах.

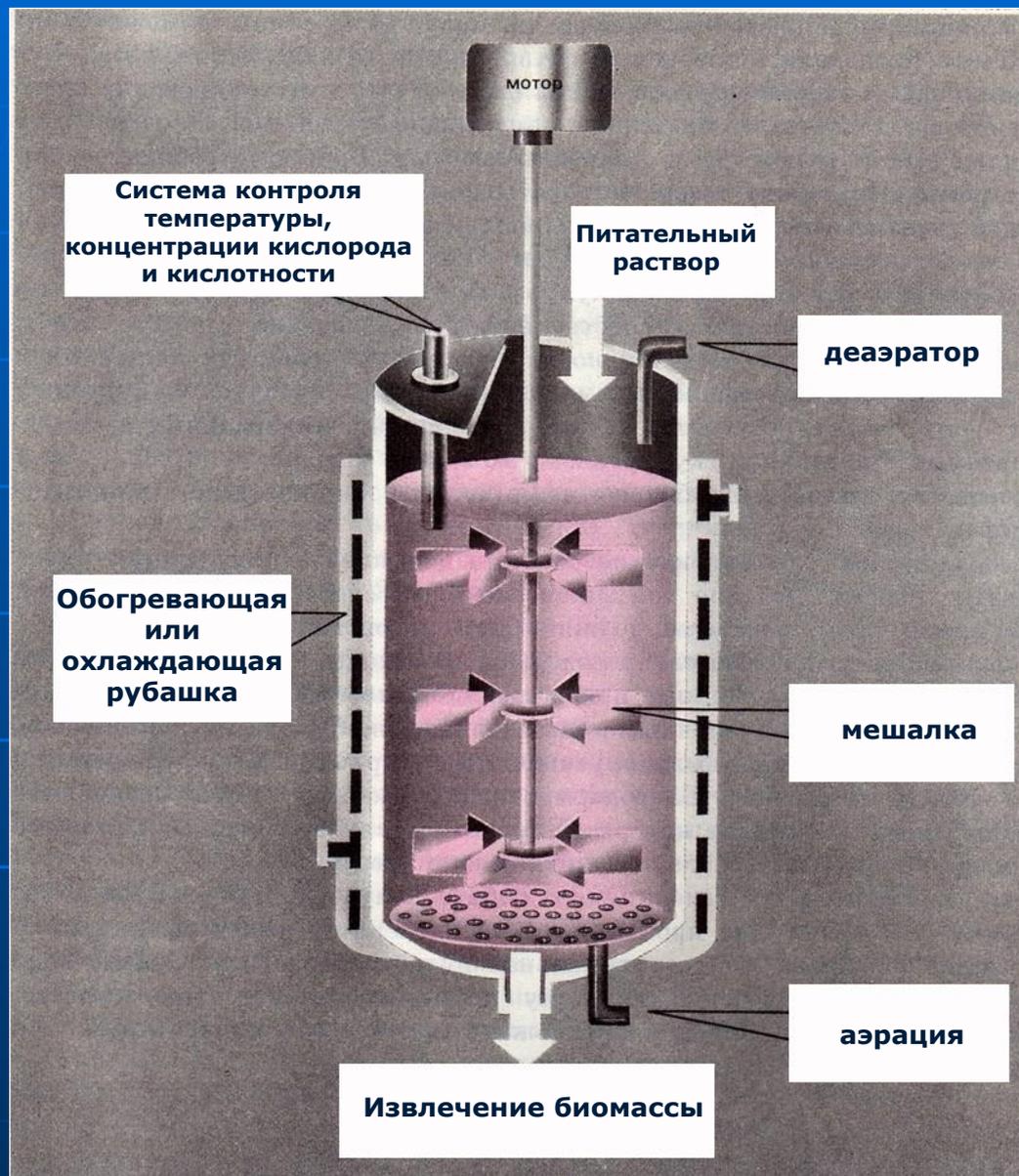
1. Лог-фаза – период адаптации микробной популяции к новым условиям обитания, новым субстратам. На этом этапе в клетках синтезируются ферментные системы для утилизации новых источников питания. Споры бацилл, актино- и микромицеты на этом этапе прорастают в вегетативные формы в результате активизации ферментативной активности микробов.

2. Лог-фаза – период активного роста и размножения клеток микроорганизмов, увеличение плотности популяции в единице объема питательной среды и биомассы.

3. Стационарная фаза – период стабилизации плотности микроорганизмов за счет динамического равновесия процессов гибели (лизиса) ряда клеток в результате увеличения концентрации токсичных продуктов обмена и процессов размножения других микробов, использующих содержимое лизированных клеток.

4. Фаза отмирания – период активного лизиса клеток микроорганизмов в результате истощения питательных веществ (субстратов) и накопления продуктов обмена (спиртов, кислот, токсинов и т. п.), снижение плотности популяции вплоть до гибели всех клеток, либо формирование защитных структур (спор, цист и др.).

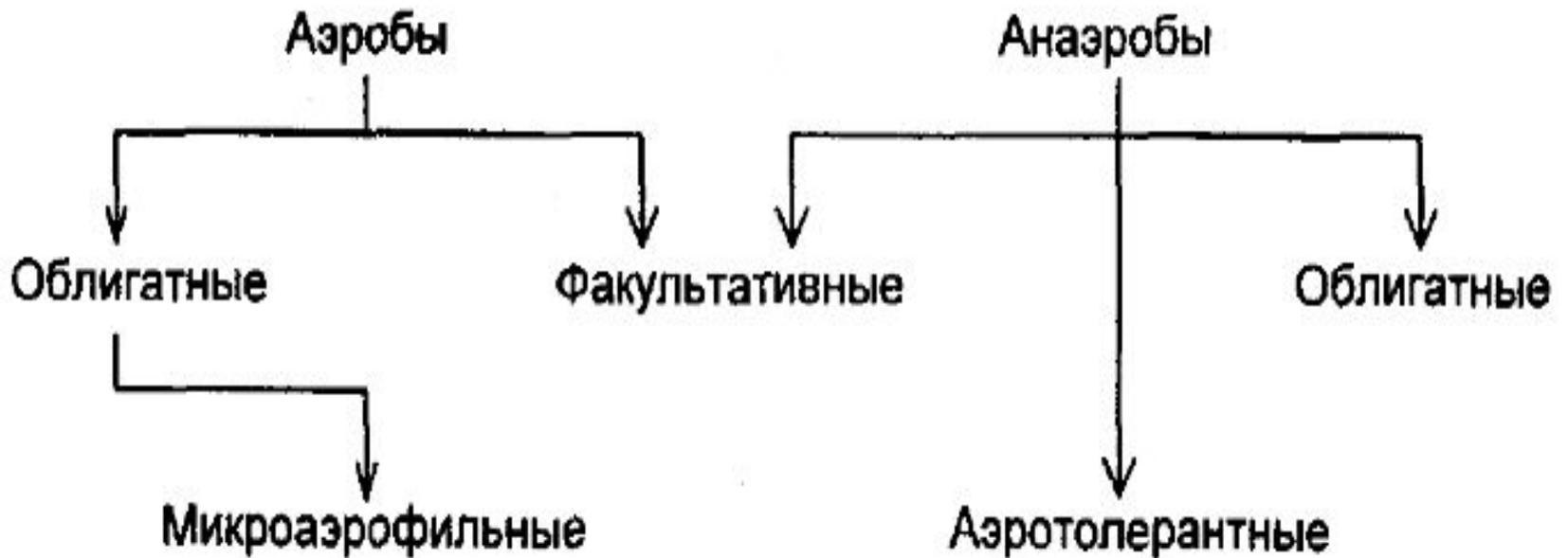
Для поддержания микроорганизмов в фазе активного роста и размножения (фаза 2) используют непрерывное культивирование и специальную аппаратуру, обеспечивающую приток питательных веществ и удаление продуктов обмена, например, ферментер. Кроме этого используют клетки микробов, адсорбированные (иммобилизованные) на различных носителях, которые постоянно снабжаются субстратами роста, а продукты обмена удаляются.



Ферментер для непрерывного культивирования микроорганизмов

Микроорганизмы имеют несколько типов окисления питательных субстратов, используя различные окислители, акцепторы водорода.

Классификация микроорганизмов по отношению к кислороду



Культивирование анаэробов проводят без доступа кислорода. Для снижения концентрации кислорода жидкие среды доводят до кипения, затем резко охлаждают и засевают культурой микроорганизмов. Поверхность питательной среды покрывают слоем минерального масла или вазелина.

Для активного роста аэробных форм микробов используют встряхиватели (шейкеры), добавляют бусы, сильные окислители, продувают стерильный воздух через жидкие питательные среды.

Классификация микроорганизмов по отношению к температуре

Микро- организмы	Температура, °С		
	Минималь- ная	Оптималь- ная	Максималь- ная
Психрофилы	$\frac{\leq 0 - 4}{\leq 0}$	$\frac{10 - 15}{5 - 10}$	$\frac{20 - 25}{20}$
Мезофилы	$\frac{10 - 12}{5 - 15}$	$\frac{25 - 37}{25 - 30}$	$\frac{40 - 50}{37}$
Термофилы	$\frac{30 - 35}{20}$	$\frac{50 - 60}{35 - 40}$	$\frac{70 - 90}{45 - 55}$

Температурный режим развития микробов.

Примечание: **числитель** - бактерии; **знаменатель** - грибы

Схема изучения чистой культуры бактерий

1. Описать характер роста бактерий в пробирках на МПА и МПБ.

Пробирки с МПА и МПБ, засеянные микроорганизмами на предыдущем занятии, извлекают из термостата и описывают характер роста бактерий по следующей схеме:

На МПА:

1. Наличие (или отсутствие) роста по штриху посева.
2. Цвет, размер, форма, поверхность, консистенция колоний.
3. Тип колоний: S – smooth (гладкая), R – rough (шероховатая), M – mucoid (мукоидная).

На МПБ:

1. Помутнение среды (слабое, среднее, сильное) или его отсутствие.
2. Образование пленки, пристеночного кольца, осадка с указанием особенностей (пленка – тонкая, толстая, гладкая. морщинистая и т.п., осадок – плотный, разбивающийся при встряхивании или нет, хлопьевидный, крошковидный, пылевидный и т.п.).

На обеих средах указывают на присутствие пигментов (эндо- или экзопигментов).

Приготовить препарат, определить морфологию бактерий в живом и окрашенном виде

Для изучения морфологии чистой культуры бактерий готовят два препарата:

препарат «раздавленная капля» и окрашенный по методу Грама препарат. В первом случае в каплю воды на предметном стекле вносят бактериальной петлей клетки микроорганизмов из пробирки с МПА, накрывают покровным стеклом и микро-скопируют с объективом х40. Это позволяет определить подвижность клеток.

Во втором случае после внесения клеток бактерий в каплю, воды на предметном стекле их перемешивают и распределяют тонким слоем по стеклу с помощью петли, чтобы затем увидеть под микроскопом отдельные клетки, а не их скопления. Приготовленный препарат окрашивают по методу Грама. Микроскопическую картину зарисовывают в поле зрения (круг) в лабораторном журнале.

3. Методы стерилизации различных материалов

Стерилизация - обеспложивание, уничтожение патогенных и непатогенных микроорганизмов, их вегетативных и споровых форм в каком-либо объекте.

Различают следующие методы стерилизации:

1. Физические методы:

- Прокаливанием (фламбирование)
- сухим нагретым воздухом

2. Влажным паром:

- кипячение
- стерилизация текучим паром
- тиндализация
- пастеризация
- стерилизация паром под давлением

3. Стерилизация фильтрованием

- с использованием керамических фильтров (Шамберлана, Беркефельда, отечественного производства)
- с использованием мембранных фильтров

4. Стерилизация УФ лучами

5. Стерилизация ультразвуком

6. Химические методы

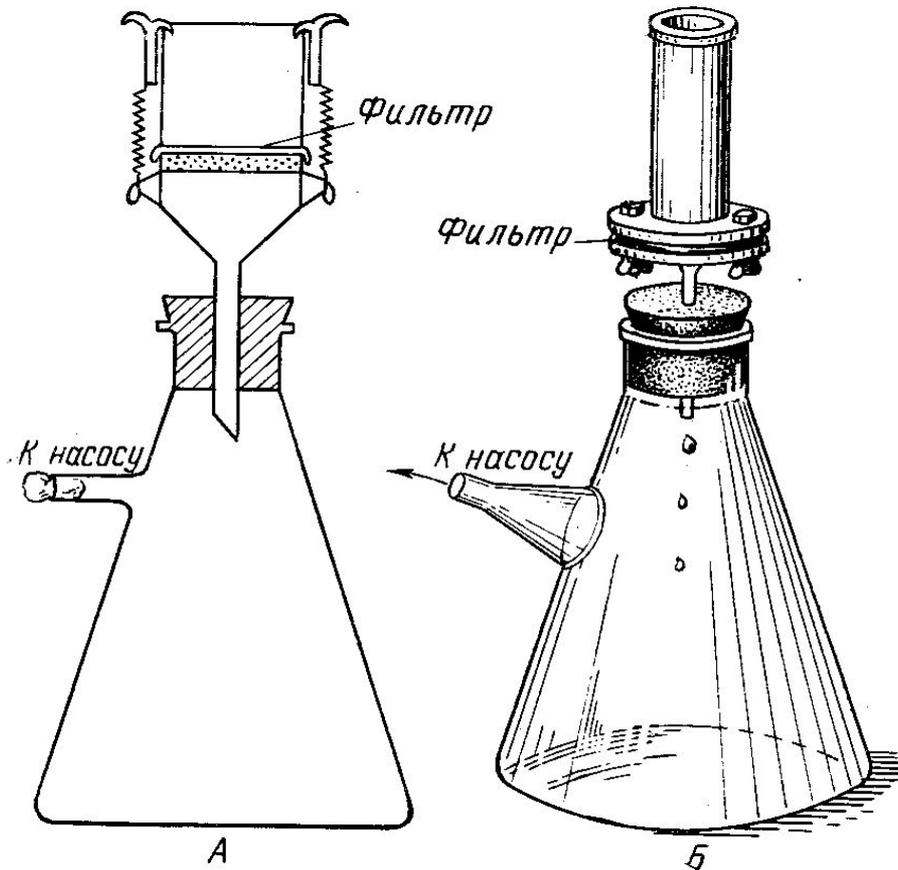
Стерилизация жидких микробиологических питательных сред

В случае разрушения, изменения химической структуры компонентов питательной среды при физических воздействиях (нагревание, облучение) используют механический метод стерилизации, пропуская жидкие среды через фильтры, задерживающие бактерии и более крупные организмы. Среда фильтруется в стерильную колбу Бунзена с разряженным воздухом при атмосферном давлении.

Тиндализация – дробная стерилизация в водяной бане при температуре 56-58⁰С в течение 5-6 дней. Первый день прогревают 2 часа, последующие дни по часу.

Пастеризация – метод неполной стерилизации, при котором продукт нагревают при температуре 80⁰С 30 мин., затем резко охлаждают (до 4-8⁰С).

Стерилизация паром под давлением (автоклавирование) – осуществляется в специальном аппарате – автоклаве. Принцип метода основан на том, что чистый насыщенный водяной пар при высоком давлении, конденсируясь, повышает температуру внутри котла (автоклава). Уменьшение объема пара после конденсации способствует проникновению его внутрь стерилизуемого объекта.



Приборы для стерилизации фильтрованием: А — со стеклянным держателем;
Б — с металлическим держателем

Фильтрация жидких сред через бактериальные фильтры (механический метод стерилизации)



Стерилизация посуды, металлических инструментов и стеклянных и в сухожаровом шкафу (150-190°C)



Стерилизация посуды, инструментов, питательных сред в автоклаве (паром под давлением)

Показателю манометра автоклава в физических атмосферах соответствует определенная температура

№	Давление. атм.	Температура, °С
1	0,5	115
2	1,0	120
3	1,5	127
4	2,0	133

Химические методы заключаются в губительном действии определённых химических соединений на микробы.

К таким веществам относятся:

сильные окислители: йод, хлор, перекиси, окислы и соли хрома, марганца, органические и минеральные кислоты и т. д., которые окисляют жизненно важные молекулы и структуры клетки, нарушая процессы обмена веществ;

поверхностно активные вещества (ПАВ): фенол, формальдегид, спирты, щелочи, моющие средства и т.д., которые способствуют коагуляции белков, нарушению ферментативной активности клетки, нарушению процессов транспорта.

Метод	Процедура	Сфера применения	Предосторожности	Ограничения
Сухой жар	прямое воздействие сухого жара + 190°C в течение 80 мин или +160°C в течение 130-160 мин	стеклянные лабораторные принадлежности и изделия из металла	высокая температура может повредить изделиям из тонкого проката или тонкой проволоки	ограничения по материалу: высокотемпературная экспозиция может привести к нежелательным изменениям свойств материала
Автоклавирование (перегретый пар под давлением)	3 действующих компонента: температура, водяной пар и давление; режимы +121 °C (15 мин) или +126°C (10мин)	стекло, ткани, жидкости при условии устойчивости материалов к высокой температуре - не ниже +121 °C	не рекомендуется для стерилизации большинства обычных пластиков	обеспечить свободный доступ и отток воздуха из изделий до начала стерилизации; обычно применяют для мелких изделий
Газовая (этиленоксид)	используется индивидуально, а также в смеси с фреоном или карбондиоксидом: от +55 до +60 °C (2-3 часа) или от +27 до +33 °C (5 часов 30 мин)	практически любые материалы за редким исключением	требуется постстерилизационная вентиляция изделий для удаления остатков газа, которые могут быть токсичны	этиленоксид - газ токсичный и взрывоопасный; процедура стерилизации не экономична
Гамма-радиация (радиоактивный источник - кобальт)	радиация, излучаемая соответствующим источником частиц	широко применяется в промышленности для стерилизации одноразовых изделий; радиационная доза рассчитывается, исходя из радиационной бионагрузки	свойства некоторых материалов могут измениться под влиянием гамма-радиации нежелательным образом	нежелательное воздействие на свойства материалов имеет кумулятивный эффект, а значит, повторная стерилизация после использования не допускается
Бетта-радиация (ускоритель частиц)	электронный поток высокой энергии	широко применяется в промышленности для стерилизации одноразовых изделий; радиационная доза рассчитывается, исходя из радиационной бионагрузки	—	—

4. Произвести учет результатов микробиологического анализа воздуха по методу Коха (определить общее количество микробов в 1 куб.м). Отобрать одну колонию и сделать посев на МПБ, МПА (косячок) для получения чистой культуры.

Расчет количества микроорганизмов в 1 куб. м воздуха проводят по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 100 \cdot 10000 \cdot 5}{b \cdot 10 \cdot t}$$

a – количество колоний на чашке Петри,

b – площадь чашки Петри (70 см²),

t – время экспозиции чашки,

5, 10, 100, 1000 – параметры по В.Л. Омелянскому



Чашка Петри с колониями бактерий и грибов

Согласно данным В.Л. Омелянского за 5 мин. на поверхность площадью 100 кв. см оседает такое количество микроорганизмов, которое содержится в 10 л воздуха. Площадь стандартной чашки Петри 70 кв. см. При расчете важно помнить, что каждая выросшая колония является потомством одной клетки или споры, осевшей на чашку из воздуха.

Результаты микробиологического анализа воздуха

Место взятия пробы	Количество колоний на чашке		Количество микробов в 1 м ³ воздуха	
	бактерий	грибов	бактерий	грибов

Сделать выводы после анализа данных таблицы, отмечая преобладание бактерий или грибов в воздухе исследованных помещений, соответствие численности микробов в 1 куб. м санитарным нормам.

Благодарю за внимание!