

Министерство образования Республики Беларусь
Учреждение образования «Витебский государственный
университет имени П.М. Машерова»
Кафедра фундаментальной и прикладной биологии

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Методические рекомендации

*Витебск
ВГУ имени П.М. Машерова
2026*

УДК 57.083.13(075.8)

ББК 28.4я73

К90

Печатается по решению научно-методического совета учреждения образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова». Протокол № 3 от 22.12.2025.

Составитель: старший преподаватель кафедры фундаментальной и прикладной биологии ВГУ имени П.М. Машерова **В.М. Коцур**

Р е ц е н з е н т :

декан факультета химико-биологических и географических наук
ВГУ имени П.М. Машерова, кандидат биологических наук,
доцент *Т.А. Толкачева*

К90 **Культивирование микроорганизмов : методические рекомендации / сост. В.М. Коцур. — Витебск : ВГУ имени П.М. Машерова, 2026. — 40 с.**

В издании перечислены общепринятые методики культивирования прокариотных и эукариотных микроорганизмов. Приведены термины и дано краткое описание методов посева и культивирования различных микроорганизмов, способов стерилизации и хранения культур микроорганизмов.

Предназначено для студентов, магистрантов, преподавателей биологических специальностей.

УДК 57.083.13(075.8)

ББК 28.4я73

© ВГУ имени П.М. Машерова, 2026

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	4
Тема 1.1. Историческое развитие культивирования микроорганизмов	5
Практическое занятие № 1	6
Тема 1.2. Актуальность применения культур микроорганизмов	6
Практическое занятие № 2	7
Тема 2.1. Принципы составления питательных сред	7
Практическое занятие № 3	9
Лабораторная работа № 1	9
Тема 2.2. Влияние условий культивирования на жизнедеятельность микроорганизмов	13
Практическое занятие № 4	13
Лабораторная работа № 2	13
Тема 3.1 Методы культивирования аэробных микроорганизмов	15
Практическое занятие № 5	16
Лабораторная работа № 3	16
Лабораторная работа № 4	17
Тема 3.2. Поверхностное и глубинное культивирование, суспензионные культуры	19
Практическое занятие № 6	19
Лабораторная работа № 5	19
Лабораторная работа № 6	20
Лабораторная работа № 7	22
Тема 3.3. Методы выделения чистых культур анаэробных микроорганизмов	24
Практическое занятие № 7	24
Лабораторная работа № 8	24
Лабораторная работа № 9	25
Тема 4.1. Методы непродолжительного хранения микроорганизмов	27
Практическое занятие № 8	27
Лабораторная работа № 10	28
Лабораторная работа № 11	30
Тема 5. Способы культивирования иммобилизованных микроорганизмов	32
Практическое занятие № 9	32
Лабораторная работа № 12	33
Тема 6. Основные типы оборудования для культивирования микроорганизмов	34
Практическое занятие № 10	35
ПРИМЕРНЫЙ ПЕРЕЧЕНЬ ТЕМ РЕФЕРАТОВ И ПРЕЗЕНТАЦИЙ	36
ПРИМЕРНЫЙ ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ К ЗАЧЕТУ	37
ЛИТЕРАТУРА	39

ПРЕДИСЛОВИЕ

Культивирование микроорганизмов — раздел микробиологии, который изучает методы и способы культивирования различных групп бактерий, грибов и протистов. Культивирование микроорганизмов — звено между микробиологией и биотехнологией.

Культуры микроорганизмов с каждым годом находят все большее применение в самых разнообразных областях биологии, медицины, сельского хозяйства и особенно биотехнологии. Их используют при решении таких общебиологических проблем, как выяснение механизмов дифференцировки и пролиферации, взаимодействия клеток со средой, адаптации, старения, биологической подвижности, злокачественной трансформации и многих других.

Важная роль отводится культурам микроорганизмов в биотехнологии при производстве вакцин и биологически активных веществ. Они являются исходным материалом для создания клеток-продуцентов, используются в целях повышения продуктивности сельскохозяйственных животных и для выведения новых сортов растений.

Культуры клеток микроорганизмов применяются для диагностики и лечения наследственных заболеваний, в качестве тест-объектов при испытании новых фармакологических веществ, а также для сохранения генофонда исчезающих видов животных и растений.

Данное издание предназначено для магистрантов факультета химико-биологических и географических наук, обучающихся по специальностям 6-05-0511-03 Микробиология и 6-05-0511-01 Биология; также оно может быть полезно лицам, интересующимся вопросами микробиологии и биотехнологии.

Тема 1.1. Историческое развитие культивирования микроорганизмов

Теоретическая часть

Исследование культивирования микроорганизмов начинается с 1830 г., когда Ш. Каньяр де Латур, Ф. Кютцинг и Т. Шванн открыли причину брожения вина (наличие клеток дрожжей).

В дальнейшем в области культивирования микробных клеток существенного прогресса не наблюдалось вплоть до 1850-х гг. Тогда Л. Пастер начал свои фундаментальные исследования по изучению физиологии дрожжевых и мицелиальных грибов и бактерий, определению пищевых потребностей данных микроорганизмов и роли кислорода в обеспечении процессов их жизнедеятельности и др. Уже в 1859 г. он создал первую жидкую питательную среду.

Со второй половины 1870-х гг. наряду с культивированием грибов (как дрожжевых, так и мицелиальных) начинается активное культивирование бактерий. Первыми бактериальными культурами, выращенными в условиях *in vitro*, стали патогенные бактерии — возбудители тяжелых заболеваний человека и животных. Метод создания чистых культур, разработанный Р. Кохом, обусловил значительные преимущества в выращивании микроорганизмов и в изучении всех аспектов их жизнедеятельности, а еще, что не менее важно, обеспечил получение воспроизводимых результатов исследований.

В 1884 г. немецкий микробиолог В. Хессе для приготовления твердых питательных сред предложил использовать в качестве уплотнителя наряду с желатином агар-агар. Это привело к созданию агаризованных питательных сред — наиболее широко распространенного варианта плотных субстратов для культивирования микроорганизмов.

В 1933 г. А. Дж. Клюйвер и Л. Х. Ц. Перкин опубликовали статью «Методы изучения обмена веществ у плесневых грибов», в которой заложили основу технологии динамического глубинного культивирования грибов с использованием колб на качалках. Кроме того, авторы предложили подходы к оценке и интерпретации результатов, получаемых при выращивании грибов в жидкой питательной среде.

В 1946 г. Ж. Моно указал на возможность характеристики роста бактерий с использованием таких количественных параметров, как удельная скорость роста, экономический коэффициент, концентрация лимитирующего субстрата. Дальнейшее применение данного аналитического подхода к оценке кинетики роста популяции микробных клеток (Ж. Моно, 1950; А. Новик, Л. Шилард, 1950) привело к активному развитию теории непрерывного культивирования хемостатного типа.

С этого времени открылись широкие горизонты для практического применения культур микробных клеток.

Практическое занятие № 1

Вопросы для подготовки к практическому занятию

1. Зарождение культивирования микроорганизмов.
2. Развитие культивирования микроорганизмов в XIX веке.
3. Работы Л. Пастера.
4. Работы М. Ролэна.
5. Работы Коха.
6. Работы В. Хессе.
7. Развитие культивирования микроорганизмов в 1900–1940-х годах.
8. Развитие культивирования микроорганизмов после Второй мировой войны.
9. Культивирование микроорганизмов в Республике Беларусь.

Тема 1.2. Актуальность применения культур микроорганизмов

Теоретическая часть

Современная биотехнология опирается на достижения естествознания, техники, технологии, биохимии, микробиологии, молекулярной биологии, генетики. Биологические методы используются в борьбе с загрязнением окружающей среды и вредителями растительных и животных организмов. К достижениям биотехнологии можно также отнести применение иммобилизованных ферментов, получение синтетических вакцин, использование клеточной технологии в племенном деле.

Широкое распространение получили гибридомы и продуцируемые ими моноклональные антитела, используемые в качестве диагностических и лечебных препаратов.

Бактерии, грибы, водоросли, лишайники, вирусы, простейшие в жизни людей играют значительную роль. С давних времен люди использовали их в процессах хлебопечения, приготовления вина и пива, в различных производствах. В настоящее время в связи с проблемами получения ценных белковых веществ, увеличения плодородия почв, очищения окружающей среды от загрязнителей, получения биопрепаратов и другими целями и задачами диапазон изучения и использования микроорганизмов значительно расширился. Микроорганизмы помогают людям в производстве эффективных питательных белковых веществ и биологического газа. Их используют при применении биотехнических методов очистки воздуха и сточных вод, при использовании биологических методов уничтожения сельскохозяйственных вредителей, при получении лечебных препаратов, при уничтожении утильсырья.

Некоторые виды бактерий используются для регенерации ценных метаболитов и лекарств, их используют с целью решения проблем биологического саморегулирования и биосинтеза, очищения водоемов.

Микроорганизмы, и прежде всего бактерии, - классический объект для решения общих вопросов генетики, биохимии, биофизики, космической биологии. Бактерии широко используются при решении многих проблем биотехнологии.

Микробиологические реакции благодаря своей высокой специфичности широко используются в процессах химических превращений соединений биологически активных природных соединений. Известно около 20 типов химических реакций, которые осуществляются микроорганизмами. Многие из них (гидролиз, восстановление, окисление, синтез и пр.) с успехом используются в фармацевтической химии. При производстве этих реакций применяются разные виды бактерий, актиномицетов, дрожжеподобных грибов и других микроорганизмов.

Создана биотехнологическая промышленность для получения антибиотиков, ферментов, интерферона, органических кислот и других метаболитов, продуцентами которых являются многие микроорганизмы.

Практическое занятие № 2

Вопросы для подготовки к практическому занятию

1. Применение культур микроорганизмов в различных областях биологии,
2. Применение культур микроорганизмов в медицине
3. Применение культур микроорганизмов в сельском хозяйстве.
4. Возможность использования культур микроорганизмов в решении экологических проблем.
5. Использование культур микроорганизмов в очистке сточных вод и обработке отходов.
6. Роль микроорганизмов в биотехнологии при производстве биологически активных веществ.
7. Роль микроорганизмов в пищевой промышленности.
8. Роль микроорганизмов в фармакологической промышленности.

Тема 2.1. Принципы составления питательных сред

Теоретическая часть

Основа любых питательных сред — *вода*, в которой нуждаются все живые клетки. Питательные вещества в воде способны образовывать истинные (минеральные соли, сахара, аминокислоты, карбоновые кислоты, спирты, альдегиды и др.) или коллоидные (белки, липиды, неорганические соединения) растворы. В качестве ингредиентов питательных сред также могут использоваться некоторые находящиеся в твердом агрегатном состоянии компоненты, которые либо образуют придонный осадок, либо равномерно распределяются по всему объему в виде взвеси, либо плавают на поверхности

раствора (частицы угля). Жидкие углеводороды при внесении в воду образуют несмешивающуюся фракцию. Кроме того что вода используется как основа питательных сред, она еще обычно служит источником кислорода и водорода для культивируемых микробных клеток (помимо органических соединений).

Обязательные компоненты всех питательных сред — **источники углерода и азота**.

Спектр и химическая природа источников углерода крайне разнообразны — от метана, метанола и углекислого газа до макромолекулярных органических молекул. Однако наиболее удобными для клеток углеродсодержащими веществами являются легкометаболизируемые углеводы (например, глюкоза).

Самыми простыми потребностями в углеродных субстратах характеризуются **автотрофные микроорганизмы**, способные в качестве единственного источника углерода использовать углекислый газ (содержащий углерод в наиболее окисленной форме) и синтезировать из него все органические вещества. Среды для выращивания автотрофов включают воду, диоксид углерода и соответствующие неорганические соли. Например, хемолитотрофные бактерии рода *Nitrobacter* ассимилируют CO_2 и получают энергию путем окисления нитритов в нитраты. Поскольку концентрация CO_2 в воздухе незначительна (0,03%) и не может удовлетворить потребности автотрофных клеток, в питательные среды вводят бикарбонат натрия (NaHCO_3), углекислый кальций (CaCO_3) и др.

Иногда используют обогащенный углекислотой воздух.

Большинство микроорганизмов гетеротрофны и в качестве основных источников углерода и энергии потребляют органические соединения. При этом органическое вещество либо окисляется или расщепляется с высвобождением энергии и образованием ряда конечных продуктов типа CO_2 , органических кислот и других, либо используется в качестве субстратов, ассимилируемых непосредственно для образования клеточных компонентов в реакциях, требующих затрат энергии. Например, бактерии *Escherichia coli* способны к росту на минимальной среде, содержащей только глюкозу и неорганические соли.

В качестве источника азота в питательные среды часто добавляют нитраты калия (KNO_3) или натрия (NaNO_3). Однако в ряде случаев в роли субстратов, обеспечивающих клетки азотом, выступают и органические вещества, а азотфиксирующие бактерии в качестве единственного источника азота усваивают молекулярный азот N_2 .

В питательных средах для культивирования микроорганизмов должны также содержаться **макроэлементы** (фосфор, калий, сера, натрий, магний, железо) и **микроэлементы** (кобальт, йод, марганец, бор, цинк, молибден, медь и др.), вводимые в состав сред в виде водных солевых растворов (за исключением процессов выращивания микроорганизмов, в которых фосфор

усваивается растущими клетками из органических источников — автолизатов, гидролизатов, экстрактов микробного, растительного или животного происхождения). Микроэлементы, необходимые клеткам в очень малых количествах, как правило, отдельно в питательные среды не вносятся, поскольку обычно являются примесями солей макроэлементов или попадают в среду другим путем (например, с водой).

Практическое занятие № 3

Вопросы для подготовки к практическому занятию

1. Основные типы и состав питательных сред для культивирования микроорганизмов различных таксономических групп.
2. Основные питательные потребности клеток.
3. Качественное и количественное содержание всех необходимых компонентов, обеспечивающих оптимальное развитие микробных клеток, полученных из различных источников.
4. Преимущества и недостатки разных типов питательных сред.
5. Подбор состава питательных сред с учетом типов питания культивируемых микроорганизмов.
6. Особенности питательных сред, предназначенных для динамического и стационарного культивирования.

Лабораторная работа № 1

Ход работы

1. Ознакомиться с характеристиками питательных сред и заполнить таблицу 1

Приготовление твердых питательных сред достигается добавлением к жидким средам определенных уплотнителей, в качестве которых могут выступать агар-агар, желатин, силикагель, каррагинан. Наиболее распространенным из уплотнителей является агар — полисахарид, выделяемый из красных морских водорослей и состоящий из агарозы (70%) и агаропектина. Он обладает рядом полезных свойств, в частности: 1) способен образовывать в воде гели; 2) плавится при температуре 100 °С и затвердевает при 45 °С; 3) не расщепляется под влиянием ферментов большинства видов микроорганизмов; 4) термолабильные вещества и живые микроорганизмы не разрушаются при добавлении к нагретому до 45 °С расплавленному агару, если смесь сразу же охладить; 5) агаровые гели имеют высокую степень прозрачности; 6) используемые концентрации 1,5–2,0% являются относительно невысокими, что весьма экономично.

Желатин — белок, приготовленный из сухожилий, кожи и костей, — в настоящее время используется для специальных целей (тест на разжижение желатина является таксономическим), однако образуемый им гель плавится

при температурах в диапазоне 25–30 °С, что является существенным недостатком. Кроме того, желатин разжижается протеолитическими ферментами многих микроорганизмов. Уплотняющая концентрация желатина 17–20%.

Силикагелем называют соли двуокиси кремния (SiO₂). Его стерильный золь готовят из раствора силиката натрия и перед использованием, для того чтобы вызвать образование геля, к нему добавляют питательную среду, содержащую электролиты. Среды на основе силикагеля (1,5–2,0%) используют для получения культур автотофных бактерий, так как при этом в них отсутствуют органические вещества. При добавлении в такие минеральные среды различных органических веществ можно исследовать способность гетеротрофных бактерий использовать их в качестве единственных источников углерода. С помощью силикагелиевых сред можно также определять потребности бактерий в витаминах.

Каррагинан («растительный желатин») добывается путем экстракции из определенных видов красных морских водорослей. Калиевые соли некоторых типов каррагинанов способны образовывать плотные (2%) прозрачные гели, которые могут быть заменителями агара. Каррагинан значительно дешевле агара, не разрушается большинством видов бактерий. Однако разливать приготовленные среды следует при высокой температуре — 55–60 °С.

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

Сыпучие (сухие) среды представляют собой массу в той или иной степени измельченного и увлажненного органического сырья (чаще всего растительного происхождения). Основное их назначение — использование в пищевой промышленности (получение соевого соуса или других ферментированных продуктов), сельском хозяйстве (силосование кормов), утилизации твердых и полужидких бытовых отходов. В бактериологической практике чаще всего используются сухие питательные среды, которые получают в промышленных масштабах — триптические гидролизаты дешевых непивцевых продуктов (рыбные отходы, мясокостная мука, технический казеин), и среды, в которых присутствуют продукты природного происхождения (мясной перевар, кровяной агар и т. д.). Многие среды для клинической микробиологии выпускаются в сухом виде, их можно хранить длительное время. Кроме того, сыпучие среды стандартны по составу, удобны в хранении и транспортировке, хорошо растворимы в воде.

Выбор состава питательной среды для культивирования предполагает, что будут учтены не только особенности химического состава среды, но и такие биофизические факторы, как кислотность, температурные режимы культивирования, способ подачи и удаления молекулярного кислорода, осве-

ценность, влажность, являющиеся определяющими для роста любой бактериальной культуры. При этом для различных групп микроорганизмов следует учитывать, что их значения неодинаковы. Температура, аэрация и давление определяются условиями культивирования, окислительно-восстановительный потенциал зависит как от состава ростовой среды, так и от условий культивирования. Контроль окислительно-восстановительного потенциала особенно важен при культивировании облигатно-анаэробных бактерий.

Таблица 1 — Основные характеристики веществ, употребляемых для уплотнения питательных сред

Характеристика (свойство)	Агар	Желатин	Силикагель
Исходный материал для получения			
Основные составляющие компоненты			
Температура плавления, °С			
Температура застывания, °С			
Чувствительность к протеазам			
Используемая концентрация			

2. Изучить составы ниже приведенных питательных сред, записать в рабочую тетрадь название сред и их составы

Охарактеризовать каждую из них согласно классификации: по составу, назначению, консистенции; указать условия культивирования микроорганизмов на каждой из сред?

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Среда 13. Выделение культур лактобацилл, (г/л): гидролизат казеина — 10, мясной экстракт — 10, дрожжевой экстракт — 5, глюкоза — 20, ацетат натрия — 5, цитрат аммония — 2, K_2HPO_4 — 2, MgSO_4 — 0,2, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,05, вода дистиллированная.

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

Среда 15, (г/л): Na_2HPO_4 — 24, KH_2PO_4 — 12, NaCl — 2, NH_4Cl — 4, гидролизат казеина — 10, дрожжевой экстракт — 5, агар — 20, pH — 7,2.

3. Приготовить 150 мл плотной питательной среды

Последовательность приготовления питательной среды с использованием сухого питательного агара, следующая:

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

3.2 Взвесить на лабораторных весах нужное количество питательной среды (5 г из расчета на 100 мл).

3.3 Засыпать сухой питательный агар в холодную воду.

3.4 Тщательно размешать. Закрыть колбу ватной пробкой, соблюдая приемы поддержания стерильности.

3.5 Поставить колбу со средой на электрическую плитку либо водяную баню. Довести среду до полного растворения агара, не допуская его пригорания.

3.6 Простерилизовать среду на паровом стерилизаторе.

3.7 Остудить среду до 45 °С.

3.8 С соблюдением приемов стерильности в ламинар-боксе разлить среду по 25 мл в стерильные чашки Петри.

3.9 Дать застыть агаризованной среде.

Тема 2.2. Влияние условий культивирования на жизнедеятельность микроорганизмов

Теоретическая часть

В процессе жизнедеятельности многие микроорганизмы образуют специфические продукты, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к другим видам организмов (клеток) или вирусов, оказывая микростатический или микробоцидный эффект. Такие вещества природного происхождения можно назвать антимикробными в широком смысле или антибиотиками в более узком. Наиболее часто активными продуцентами антибиотических веществ являются мицелиальные грибы, актиномицеты (особенно представители стрептомицетов) и спорообразующие бактерии.

Существует несколько методов определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Наибольшее практическое распространение получили метод бумажных дисков (или диско-диффузионный), пропитанных растворами антибиотиков, и метод серийных разведений антибиотика в жидкой или агаризованной питательной среде.

Практическое занятие № 4

Вопросы для подготовки к практическому занятию

1. Способы оптимизации условий, обеспечивающие максимальный уровень продукции биомассы и микробных метаболитов.
2. Стадии роста культуры микроорганизмов.
3. Физические факторы, оказывающие влияние на рост и размножение микроорганизмов
4. Отношение микроорганизмов к температуре.
5. Потребность в кислороде и аэрация.
6. Потребности микроорганизмов в микро- и макроэлементах.
7. Группы микроорганизмов по потребностям к питательным веществам.

Лабораторная работа № 2

Ход работы

1. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам

Определение чувствительности к антибиотикам методом бумажных дисков основано на диффузии антибиотика в питательную среду. Концентрация антибиотиков в стандартных дисках подобрана таким образом, чтобы при их использовании диаметр зоны задержки роста специально подобранных тест-организмов находился в определенном диапазоне (от 0 до 30–40 мм).

Бактерии исследуемого штамма (0,1 мл суспензии с плотностью около 10^7 – 10^8 кл/мл, находящейся в стационарной стадии роста) высевают шпателем на поверхность агаризованной среды в чашке Петри. Затем стерильным

пинцетом на засеянную поверхность помещают на равном расстоянии друг от друга, от краев и центра чашки стандартные, выпускаемые промышленностью, бумажные диски, пропитанные растворами различных антибиотиков. Засеянные чашки выдерживают в термостате при температуре, оптимальной для роста исследуемых бактерий. Если бактерии чувствительны к данному соединению, то вокруг дисков образуется зона задержки роста. Диаметр зоны задержки роста соответствует степени чувствительности исследуемого микроорганизма к данному антибиотику. Диаметр зоны задержки роста более 25–30 мм обычно соответствует высокой степени чувствительности, менее 10 мм — слабой.

2. Метод серийных разведений антибиотика в жидкой питательной среде позволяет путем определения минимальной ингибирующей концентрации антибиотика количественно охарактеризовать его активность в отношении исследуемых микроорганизмов. Для правильной постановки эксперимента необходимы:

- питательные среды, обеспечивающие оптимальные условия роста исследуемого микроорганизма и не содержащие веществ, инактивирующих антибиотик;
- растворы антибиотиков;
- культуры микроорганизмов, исследуемые на чувствительность к антибиотикам.

Работу начинают с приготовления растворов антибиотика. Для этого в ряд стерильных пробирок наливают по 2 мл жидкой полноценной питательной среды. В пробирку 1 вносят 2 мл раствора антибиотика (исходная концентрация препарата 200–500 мкг/мл), смесь тщательно перемешивают. После этого 2 мл жидкости из пробирки 1 стерильной пипеткой переносят в пробирку 2, повторяя перемешивание, далее 2 мл из пробирки 2 переносят в пробирку 3 и т. д. Из пробирки 4 удаляют 2 мл раствора антибиотика. При таком способе разведения в каждой последующей пробирке концентрация антибиотика будет в 2 раза меньше, чем в предыдущей. Среда в пробирке 5 не должна содержать раствора антибиотика и служит контрольной для определения роста культуры.

После приготовления разведений во все пробирки вносят по 0,1 мл взвеси клеток с таким расчетом, чтобы в 1 мл содержалось 10^5 – 10^4 клеток. Пробирки энергично перемешивают и помещают на 18–20 ч для выращивания при оптимальной для роста исследуемых бактерий температуре. Учет результатов проводят следующим образом: вначале просматривают контрольную пробирку, чтобы по помутнению среды определить наличие роста микроорганизмов. Помутнение среды указывает на наличие высокой численности бактерий (более 10^7 кл/мл). Среда же в пробирках, содержащих антибиотик в концентрациях, достаточных для подавления роста микроорганизмов, остается прозрачной.

Наименьшая концентрация антибиотика, при которой размножение микроорганизмов уже не происходит, а содержимое пробирок остается прозрачным, соответствует минимальной ингибирующей (подавляющей) рост концентрации данного антибиотика в отношении изучаемого микроорганизма.

Для определения характера (микростатического или микробоцидного) действия антибиотика на рост бактерий требуется постановка дополнительных экспериментов. Для этого бактериологической петлей из пробирок, содержимое которых не помутнело, проводят посев на полноценную питательную агаризованную среду. Наличие роста культуры после инкубирования говорит о микростатическом, т. е. задерживающем рост клеток, действии антибиотика, а отсутствие признаков роста является свидетельством того, что при такой концентрации развитие микроорганизмов полностью подавляется данным соединением и, следовательно, она является микробоцидной.

3. Метод серийных разведений антибиотика в агаризованной среде удобен тем, что позволяет в одном опыте проверить чувствительность к данному антибиотику нескольких микроорганизмов. Разведения антибиотика готовят в стерильной агаризованной среде. Для этого в нее добавляют требуемое количество исходного раствора антибиотика, тщательно перемешивают и заливают в стерильные чашки Петри. После застывания агара дно чашки с наружной стороны делят маркером на секторы. Каждую исследуемую культуру засевают штрихом с помощью бактериологической петли на отдельный сектор в чашках с разными концентрациями антибиотика.

Чашки помещают в термостат при температуре, оптимальной для роста и развития изучаемых бактерий, и инкубируют в течение 48–72 ч. Результаты учитывают по наличию или отсутствию роста бактерий по сравнению с ростом на среде без антибиотика. Бактерии считаются чувствительными к антибиотику в такой его концентрации, при которой их рост полностью подавляется.

Тема 3.1 Методы культивирования аэробных микроорганизмов

Теоретическая часть

Посев микроорганизмов осуществляется бактериологической петлей. Отбор клеток микроорганизмов производят следующим образом. В правую руку берут петлю и стерилизуют ее нагреванием в пламени спиртовки. Пробирку с культурой берут в левую руку так, чтобы поверхность питательной среды с выросшими колониями микроорганизмов была хорошо видна. Не выпуская петли, мизинцем и безымянным пальцем правой руки, прижимая пробку к ладони, вынимают ее из пробирки и держат так во

время всех дальнейших манипуляций. Край открытой пробирки обжигают в пламени спиртовки и вводят в пробирку стерильную петлю. Петлю охлаждают прикосновением к внутренней поверхности стекла пробирки или на свободной от микроорганизмов части среды и после этого захватывают небольшое количество микробной биомассы. Осторожно вынимают петлю из пробирки, горлышко пробирки вновь обжигают, пробку проводят над пламенем спиртовки и закрывают ею пробирку. Пробирку с культурой помещают в штатив, а извлеченную культуру переносят в жидкую питательную среду, находящуюся в другой пробирке или колбе. Оставшиеся на петле после посева клетки микроорганизмов тщательно сжигают в пламени спиртовки.

При культивировании микроорганизмов в жидкой питательной среде с последующим описанием характера их роста отмечают степень помутнения (слабая, умеренная или сильная), особенности образующейся пленки (тонкая, плотная или рыхлая, гладкая или складчатая), формирующийся осадок (плотный, рыхлый, слизистый, хлопьевидный). Можно упомянуть появление пигментации или выделение газообразных продуктов.

Чистые культуры микроорганизмов, как правило, выделяют внутри или на поверхности твердых питательных сред. Для выделения чистых культур микроорганизмов из объектов окружающей среды, содержащих обильную микрофлору, предложено много различных методов. Все они основаны на выделении из популяции одной клетки.

Практическое занятие № 5

Вопросы для подготовки к практическому занятию

1. Методы выделения чистых культур аэробных микроорганизмов.
2. Влияние условий культивирования на жизнедеятельность микроорганизмов.
3. Динамика и параметры роста культуры микроорганизмов.
4. Характерные особенности разных фаз роста культуры.
5. Динамические и статические (стационарные), открытые и закрытые системы культивирования.

Лабораторная работа № 3

Ход работы

1. Ознакомиться с методикой посева и провести посев лабораторных культур Грам+ и Грам- микроорганизмов на питательные среды

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

При описании роста по штриху отмечают следующие особенности: однородный, скудный, умеренный или обильный, сплошной, диффузный, перистый, ризоидный и т. д. Характеризуют оптические свойства налета, его цвет, поверхность, консистенцию.

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

При посеве микроорганизмов *из жидкой среды с использованием микробиологического шпателя* поступают следующим образом. На поверхность среды в чашке с помощью стерильной пипетки наносят заданный объем жидкой культуры. Одновременно, вращая чашку и делая круговые движения стерильным шпателем, суспензию распределяют по всей поверхности среды.

2. После периода культивирования в термостате микроскопически оценить успешность высева и культивирования выбранных видов микроорганизмов.

Лабораторная работа № 4

Ход работы

1. Ознакомиться с основными методами выделения чистой культуры аэробных микроорганизмов

Метод разбавлений Пастера. Из суспензии, содержащей смесь микроорганизмов, делается ряд последовательных разведений в стерильной жидкой питательной среде. С каждым разведением количество микроорганизмов, попадающих в пробирку, будет уменьшаться и можно таким образом получить такие разведения, когда в объеме среды в пробирке будет находиться только одна клетка, из которой и разовьется чистая культура.

Однако этот метод не всегда дает возможность получить чистую культуру и в настоящее время практически мало используется.

Выделение чистой культуры из одной клетки капельным методом. Предварительно подготавливается разведение культуры микроорганизма в питательной среде с таким расчетом, чтобы в небольшой капле этой среды могли быть единичные клетки. Затем на поверхность стерильного стекла с помощью простерилизованной иглы и стеклянной палочки наносят ряды мелких капель среды, содержащей микроорганизмы. Стекло перевертывают и помещают над лункой предметного стекла. Края лунки предварительно обмазывают вазелином. Затем все капли просматривают под микроскопом и отмечают те из них, в которых находится только одна клетка.

Стекло помещают в чашку Петри, на дне которой находится увлажненная фильтровальная бумага, и ставят в термостат; клетка размножается, образуя микроскопическую колонию. Полученную колонию снимают стерильной фильтровальной бумагой, которую держат простерилизованным на пламени пинцетом, и переносят в пробирку с питательной средой.

Выделение чистой культуры капельным методом используется при работе с крупными микроорганизмами (дрожжи, плесени). Выделение чистой культуры с помощью микроманипулятора. Для выделения под контролем микроскопа одиночных микробных клеток и их посева применяют специально оборудованные микроскопы -микроманипуляторы. Отдельные микробные клетки в них вылавливаются из висячей микрокапли микропипеткой и микропетлей, перемещаемыми в поле зрения микроскопа с микронной точностью с помощью системы винтов и рычагов.

Для выделения аэробов наиболее распространен в микробиологической практике метод **выделения чистой культуры с помощью твердых сред (метод Коха)**. Метод заключается в получении чистой культуры из отдельной колонии, выросшей на твердой питательной среде в результате размножения одной клетки. Метод основан на том, что при нанесении микроорганизмов из посевного материала на твердую среду отдельные клетки будут закрепляться (иммобилизоваться) в определенной точке твердой среды и, размножаясь, давать потомство (клон), представляющее чистую культуру микроорганизма

Для получения изолированных колоний на твердой среде исследуемый материал высевают на поверхность твердой питательной среды, наносят петлей или пипеткой каплю исследуемого материала. Рассев проводят либо методом истощающего мазка, либо методом истощающего штриха. В первом случае шпателем равномерно распределяют нанесенную каплю по поверхности твердой среды. Тем же шпателем делают посев на поверхности второй пластинки и затем третьей, т. е. перенося последовательно на твердую среду клетки микроорганизмов, которые остались на шпателе.

Таким образом, количество микроорганизмов, вносимых последовательно на пластинки, будет уменьшаться: на вторую — меньше, чем на первую; на третью — еще меньше, чем на вторую.

Недостатком этого метода является то, что иногда получаются не чистые, а смешанные культуры. Это является результатом того, что колонии могут образоваться не из одной, а из двух или нескольких клеток, попавших в одну точку. Поэтому этот метод выделения чистых культур требует двух- или трехкратного повторения выделения культур из одной колонии. Для этого готовят суспензии культур микроорганизмов изолированных колоний в стерильной водопроводной воде.

Из каждой суспензии стерильной пипеткой делают разведение в стерильной водопроводной воде (1 капля суспензии на 8–10 мл воды) и взвесь

микроорганизмов рассеивают на поверхность плотной питательной среды в чашки Петри, которые помещают на 3–4 суток в термостат.

Через 3–4 суток просматривают выросшие колонии и сверяют их признаки с отмеченными признаками при выделении культуры.

2. Произвести выделение микроорганизмов предложенными методами.
3. После периода инкубации оценить успешность посева культур микроорганизмов.

Тема 3.2. Поверхностное и глубинное культивирование, суспензионные культуры

Практическое занятие № 6

Вопросы для подготовки к практическому занятию

1. Классификация способов культивирования микроорганизмов.
2. Методы создания и биологические свойства синхронных культур микроорганизмов.
3. Управляемое культивирование микроорганизмов с заданными свойствами.
4. Особенности культивирования бактериальных клеток.
5. Особенности культивирования дрожжевых клеток.
6. Особенности культивирования мицелиальных грибных культур.
7. Особенности культивирования клеток протистов.
8. Условия получения, регенерация клеточной стенки и культивирование бактериальных и грибных протопластов.
9. Суспензионные культуры и их особенности.

Лабораторная работа № 5

Ход работы

1. Познакомиться с основными методиками посева микроорганизмов.

Пересев микроорганизмов методом реплик

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

очередь производится отпечаток на чашку со средой, на которой находились исходные микроорганизмы.

Глубинный посев микроорганизмов

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

Культивирование микроорганизмов в полужидких средах

В ряде случаев используют выращивание бактерий в полужидких средах, которые содержат уплотняющее вещество в низкой концентрации. Такие среды пригодны для культивирования микроаэрофильных бактерий, изучения подвижности клеток и хемотаксиса. При использовании 0,1–0,4%-ного агара гелеобразующие вещества расслаивают среду таким образом, что конвекционные потоки не способны смешивать богатые кислородом верхние слои среды с нижними. Единственным путем для проникновения кислорода в более глубокие слои в данном случае является диффузия, что создает градиент концентрации кислорода. При инокуляции среды в пробирке уколом петлей микроаэрофилы начинают расти несколько ниже поверхности, где концентрация кислорода для них наиболее благоприятна. Анаэробы растут в нижней части полужидкой среды.

После периода инкубации оценить зрительно и микроскопически оценить успешность культивирования.

2. Провести поверхностный и глубинный посев предложенных видов микроорганизмов.

3. После периода инкубации оценить успешность посева культур микроорганизмов.

Лабораторная работа № 6

Ход работы

1. Познакомиться с основными питательными средами для культивирования грибных клеток.

Среда Сабуро (жидкая/твердая): Дрожжевая вода (полученная кипячением дрожжей), пептон, агар (для твердой), глюкоза, вода, антибиотик (хлорамфеникол). Для приготовления среды Сабуро (для грибов и дрожжей) порошок разводят в дистиллированной воде, нагревают до полного растворения и стерилизуют автоклавированием (121 °С, 15 мин), не перегревая, а затем разливают в чашки Петри. Порошок растворяют в дистиллированной

воде, перемешивают, нагревают до полного растворения и стерилизуют автоклавированием.

YPD (дрожжевой экстракт пептон декстроза, Yeast extract-Peptone-Dextrose): экстракт дрожжей, пептон, декстроза. Для приготовления YPD для дрожжей смешивают компоненты в воде, а для твердой среды добавляют агар-агар, затем стерилизуют автоклавированием. Типичные пропорции: 10 г дрожжевого экстракта, 20 г пептона и 20 г декстрозы (глюкозы) на 1 литр воды, с добавлением 20 г агара для получения агаризованной среды.

Картофельно-декстрозный агар/бульон (КДА, PDA/PDD): Картофельный отвар, декстроза, агар. Картофель — 200 г; декстроза — 15 г; агар — 15 г; вода дистиллированная до 1 л. Вымытый картофель (с кожурой) нарезать кубиками, промыть водой и поместить в емкость с 1 л водой, варить 1 час, гомогенизировать блендером и довести объем до 1 л. Стерилизовать 15 минут при 118–121°C. Охладить до 45–50°C, тщательно перемешать и разлить в чашки Петри.

Среда Докса — Чапека: содержит сахарозу (источник углерода), нитрат натрия (единственный источник азота), фосфаты, магний, калий, железо и другие микроэлементы.

Пивное сусло-агар: неохмеленное пивное сусло разводят водопроводной водой до содержания сахара 7–8° по Баллингу (измеряют сахарометром) и стерилизуют в бутылках при 110 °С 10 мин. В таком виде сусло может сохраняться длительное время. Перед употреблением надосадочную жидкость осторожно сливают с осадка. В 1 л стерильного сусла добавляют 18 г агара, нагревают до растворения агара и разливают среду в стерильные пробирки, стерилизуют при 110°C 10 мин. Жидкое сусло после сливания отстоявшейся жидкости с осадка разливают в пробирки или колбы и стерилизуют

Рисовая среда Левиной (для быстрой идентификации *Candida albicans*): 20 г риса в зернах измельчают в ступке и заливают 500 мл дистиллированной воды, стерилизуют текучим паром 45 мин. Укрывают тепло и оставляют для отстаивания, затем фильтруют через 4 слоя марли. Осадок не отжимают. 20 г агара расплавляют на открытом огне или текучим паром в 500 мл дистиллированной воды, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Фильтрат агара смешивают с фильтратом риса и добавляют дистиллированной воды до 1 л. Стерилизуют при 1 атм (120 °С) 20–30 мин. Разливают в чашки Петри, на которые производят прямой посев материала.

2. Произвести посев дрожжевой культуры и мицелиальной культуры на предложенные питательные среды.

3. После периода инкубации оценить зрительно и микроскопически оценить успешность культивирования.

Лабораторная работа № 7

Ход работы

1. Познакомиться с основными средами для культивирования протистов.

Среды для амёб

Почвенно-древесный настой. Наиболее часто применяется для культивирования *A. Proteus*. Составляется смесь из почвенного настоя и

настоя на древесных ветках. Почвенный настой готовится заливкой $\frac{1}{4}$ по объему огородной почвы $\frac{3}{4}$ сырой воды и выдерживается 7–10 дней. В течение такого же срока настаивается сырая вода на молодых ветках лиственных деревьев (лучше березы). После сливания равных частей этих настоев среда готова для заражения через 5–7 дней, в зависимости от степени развития в ней простейших, служащих пищей амёбам. Для заражения такой среды амёб вылавливают пипеткой из ила, в пробе, взятой в водоеме. Пересевы на свежую среду производят раз в 2–3 месяца.

Отвар рисовых зерен. Для этого круто отваривают рис, несколько десятков отдельных рисовых зерен помещается в чашки Петри и заливается кипяченной водой. Через несколько дней, когда вокруг зернышек разовьется бактериальная флора, производится заражение амёбами. Пересевать амёб в новые чашки нужно раз в два-три месяца.

Среда Чокли используется в нескольких модификациях (в гр. На 1 л дистиллированной воды): NaCl — 0,08, Na₂HPO₄ — 12, H₂O — 0,001, NaHCO₃ — 0,004, KCl — 0,002, CaHPO₄ — следы.

Среда Прескотта (в гр. На 1 л дистиллированной воды): NaCl — 0,01, MgSO₄ — 0,002, CaCl₂ — 0,01, CaHPO₄ — 0,004, KCl — 0,006.

Среда Принсгейма (в гр. На 1 л дистиллированной воды): Ca(NO₃)₂•H₂O — 0,2, MgSO₄•7H₂O — 0,02, KCl — 0,026, FeSO₄•7H₂O — 0,002, Na₂HPO₄•2H₂O — 0,02.

Среды для жгутиконосцев

Пептоно-виноградная среда: 0,5 г пептона, 0,5 г виноградного сахара, 0,2 г лимонной кислоты, 0,2 г сернокислой магнезии, 0,05 г. Фосфорнокислого калия (K₂HPO₄) и 100 см³ воды.

Навозный настой. Культивирование *Bodo* удаётся в «навозных» культурах. Небольшое количество слегка перепревшего конского навоза заливают на $\frac{3}{4}$ водой. Через несколько дней наблюдается массовое развитие различных простейших, и в том числе *Bodo*.

Искусственные среды: некоторые виды *Euglena* (*E. Gracilis*, *E. Viridis*, *E. deses*) удаётся довольно легко культивировать в минеральных средах:

Среда Кноппа: вода дистиллированная 1000 г, MgSO₄ — 0,25, Ca(NO₃)₂ — 1,0, KH₂PO₄ — 0,25, KCl — 0,12, FeCl₃ — следы.

Среда Бенеке: вода дистиллированная 1500 г, NH₄NO₃ — 0,3, CaCl₂ — 0,15, K₂HPO₄ — 0,15, MgSO₄ — 0,15, FeCl₃ — следы.

Среда Прагга: KNO₃ — 0,1, MgSO₄ — 0,01, K₂HPO₄ — 0,01, FeCl₃ — 0,001 г/л.

Основная масса зоофлагеллят питается бактериями. Наиболее пригодными при выращивании жгутиконосцев являются бактерии *Aerobacter aerogenes*. Для культивирования жгутиконосцев в среду добавляют живых или убитых бактерий. Можно в среду вместо бактерий добавлять любое быстро разлагающееся органическое вещество, которое служит пищей для бактерий: стерильное молоко, этанол, метанол, дрожжевой автолизат, уксуснокислый натрий, пептон, глюкоза, сахароза, мясной бульон (0,25% либиховского экстракта).

Среды для инфузорий

Сенной отвар. Культуральной средой может служить сенной отвар: 15 грамм сухого измельченного сена кипятят в колбе с чистой водой в течение 15–30 минут, затем фильтруют. Среду разливают в чашки Коха или в стеклянные банки. Сосуды с отваром оставляют открытыми на несколько дней, пока в нем не разовьются в массе сенные бактерии (*Bacillus subtilis*), являющиеся прекрасной пищей для инфузорий. Через 1–2 дня в отвар вносят парameций, которые в таких культурах быстро размножаются и сохраняются несколько недель. Чтобы поддерживать культуру, ее необходимо время от времени пересевать, т.е. полстакана культуры прибавляют в банку со свежим сенным настоем или иной питательной жидкостью.

Молочный раствор. В чистые химические пробирки (лучше новые, не бывшие в употреблении) наливают по 15–20 куб. см. воды (водопроводной, колодезной, дождевой). В каждую пробирку прибавляют по 2–3 капли сырого молока и взбалтывают. В каждую пробирку впускают примерно 10–20 парameций и неплотно затыкают кусочком ваты. Через 5–7 дней инфузории сильно размножаются и могут жить в этой пробирке месяцами. Два раза в месяц в пробирки добавляют по капле молока. Кроме парameций, на молочном растворе с таким же успехом разводятся брюхо-ресничные инфузории — стилонихии и спиростомум. В молочном растворе инфузории питаются размножающимися молочнокислыми бактериями.

Настой салата. В стеклянные сосуды с кипяченой водой опускают предварительно прокипяченный мешочек из «газа» или тюля с листьями салата. Сосуды закрывают стеклянной пластинкой. В таком настое развивается, особенно благоприятная для питания туфельек, бактериальная флора.

Сенной настоем. Берут луговое сено, режут его и кладут в стеклянный сосуд с дождевой водой. Дня через три к подученному сенному настою приливают полстакана воды из пруда или водоема, богатого разлагающимися органическими веществами.

2. Приготовить среды для культивирования инфузорий, используя в качестве стартовой культуры детрит из аквариума (1 мл).

3. После инкубации при комнатной температуре в течение недели оценить с помощью микроскопа плотность культуры инфузорий в приготовленных средах.

Тема 3.3. Методы выделения чистых культур анаэробных микроорганизмов

Теоретическая часть

Граница между аэробными и анаэробными микроорганизмами относительно условна; при этом строго облигатными анаэробами обычно считают бактерии, рост которых невозможен в присутствии растворенного кислорода. На практике к анаэробным относят те бактерии, которые не растут на поверхности твердой или полужидкой среды на воздухе при атмосферном давлении. Аэротолерантные бактерии хорошо растут на поверхности агара в чашках Петри при низком парциальном давлении кислорода. Степень анаэробнозиса измеряется по окислительно-восстановительному (редокс, Eh) потенциалу среды. При увеличении Eh выше 100 мВ, обусловленном присутствием растворенного кислорода, подавляется рост всех анаэробных бактерий. Для удаления кислорода и создания соответствующих условий среды можно воспользоваться следующими методами.

Практическое занятие № 7

Вопросы для подготовки к практическому занятию

1. Методы выделения чистых культур анаэробных микроорганизмов.
2. Особенности культивирования анаэробных микроорганизмов.
3. Основные способы культивирования анаэробных микроорганизмов.
4. Основные механические, физические, химические и биологические методы культивирования анаэробов.
5. Анаэроостаты и их конструкция.
6. Культивирование экстремальных анаэробных микроорганизмов.

Лабораторная работа № 8

Ход работы

1. Ознакомиться с различными способами культивирования анаэробных микроорганизмов.

А. Культивирование в микроанаэроостате — аппарате для выращивания микроорганизмов, в котором воздух замещен газовой смесью. Наиболее часто используемая смесь имеет следующий состав: азот 90%, CO₂ и H₂ по 5%.

В. Использование химических веществ, поглощающих молекулярный кислород. В качестве поглотителей молекулярного кислорода в лабораторной практике используют щелочной раствор пирогаллола, дитионит натрия (Na₂S₂O₄), металлическое железо, хлорид одновалентной меди и некоторые другие реактивы. Поглотители помещают на дно химического эксикатора с притертой крышкой; туда же вносят анаэробные бактерии, засеянные в колбу, пробирку или чашку Петри. При таком способе создания анаэробных условий

необходимо учитывать поглощающую способность химических веществ и объем замкнутого пространства, в котором выращиваются бактерии.

С. Использование восстанавливающих агентов, которые добавляют в большинство сред для снижения их окислительно-восстановительного потенциала: тиогликолата натрия, цистеина, дитиотреитола, аскорбиновой кислоты. Удаления кислорода из среды можно добиться также в результате быстрого нагревания и кипячения среды с последующим быстрым охлаждением. Если в такую среду засеять анаэробные микроорганизмы и наслоить смесь масла и парафина (1 : 1), то будет наблюдаться рост нестрогих анаэробов. Возможно использование полужидких (0,05–0,1%-ного агара) сред для уменьшения конвенционных потоков.

Д. Выращивание совместно с аэробными или факультативно-анаэробными бактериями. В жидкой среде с восстанавливающими агентами перед инокуляцией анаэроба проводят культивирование, например *E. coli*, что приводит к удалению из среды остаточного кислорода. Перед инокуляцией анаэробов клетки *E. coli* убивают нагреванием. Существует и другая модификация метода. На одной половине чашки Петри засевают какой-либо аэробный микроорганизм, на другой — анаэроб. Края чашки заливают парафином. Рост анаэробного микроорганизма начнется только после полного использования кислорода аэробом.

Е. Культивирование под слоем вазелинового масла. В пробирку вносят твердую или жидкую питательную среду. Производят посев микроорганизмов

Ф. Посев в трубочки по методу Виньял — Вейона. В пробирки с 0,5% стерильным расплавленным и охлажденным агаром (40–45 °С) вносят культуру анаэробных микроорганизмов, затем содержимое пробирки набирают в пастеровскую пипетку, заполняя засеянной средой весь ее капилляр. После заполнения конец трубки запаивают.

Содержание кислорода можно контролировать с помощью некоторых химических веществ, например раствора резазурина, щелочного раствора глюкозы с метиленовым синим.

2. Произвести посев культуры анаэробных микроорганизмов предложенными методами.

3. После периода инкубации оценить зрительно и микроскопически оценить успешность культивирования.

Лабораторная работа № 9

Ход работы

1. Ознакомиться с методами выделения культур облигатных анаэробов.

А. Метод Цейслера. Исследуемый материал рассеивают штрихами по поверхности плотной питательной среды, помещают в анаэробные условия и выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 24–72 ч. Изолированные колонии анаэробов пересеивают в среду для контроля стерильности (СКС) или среду Китта — Тароцци.

В. Метод Вейнберга. Несколько капель исследуемого материала вносят в пробирку с 0,9% раствором хлористого натрия, перемешивают и переносят в пробирку с охлажденным сахарным агаром, разлитым высоким столбиком. После перемешивания последовательно засевают еще две пробирки с сахарным агаром и быстро охлаждают под струей холодной воды. Выросшие через 24–72 ч в глубине агара изолированные колонии анаэробов засевают в среду Китта — Тароцци или СКС.

С. Метод Вейона — Виньяля. Готовят разведения исследуемого материала в пробирках с сахарным агаром. Из каждой пробирки разведенный материал насасывают в пастеровские пипетки и запаивают их концы. После получения микробного роста пипетку надпиливают в соответствующем месте, разламывают с соблюдением правил стерильности и переносят изолированную колонию в среду Китта — Тароцци или СКС.

Д. Метод Перетца. Готовят разведения исследуемого материала. Содержимое пробирки с соответствующим разведением выливают в стерильную чашку Петри, на дне которой на двух стеклянных или деревянных палочках лежит стеклянная пластинка. Среду заливают сбоку таким образом, чтобы она заполнила все пространство между пластинкой и дном чашки Петри. При появлении микробного роста стеклянную пластинку удаляют, а изолированную колонию засевают в пробирку со средой Китта — Тароцци или СКС для получения чистой культуры. Наиболее простой и удобной разновидностью метода Перетца является метод «перевернутых чашек». При этом каждое разведение исследуемого материала в пробирке с сахарным агаром заливают в крышку чашки Петри и закрывают ее стерильным доннышком чашки, избегая образования пузырей воздуха. Щель между краями крышки и дном чашки Петри заливают расплавленным парафином. Термостатируют при температуре 37 °С до появления изолированных колоний анаэробов.

Е. Колонка Виноградского. Для монтирования колонии Виноградского используют стеклянный цилиндр высотой 30 см и диаметром 8 см (объем — 500–1000 мл), ил или влажную почву (500–700 г), карбонат кальция (CaCO_3), сульфат кальция (CaSO_4), измельченную фильтровальную бумагу, дистиллированную воду, пластиковую крышку, источник света (окно или лампа дневного света).

Ил очищают его от мусора, добавляют 5 г CaCO_3 и 5 г CaSO_4 и 10 г измельченной фильтровальной бумаги (можно добавить яичный желток). Тщательно перемешивают. Полученную массу помещают в колонку и тщательно утрамбовывают, чтобы удалить воздушные полости, добавляют воды (она должна покрывать ил на 2–3 см). В колонке должно было остаться 2–3 см воздушного пространства над водой. Затем колонку герметично укупоривают. Колонку инкубируют при комнатной температуре и непрямом солнечном свете (на окне).

Тема 4.1. Методы непродолжительного хранения микроорганизмов

Теоретическая часть

Практически в любой микробиологической лаборатории имеются коллекции культур микроорганизмов, которые могут использоваться в научно-исследовательских целях, в промышленных технологиях, при обучении работе с популяциями клеток и т. п. Следовательно, очень важно соблюдать правила хранения и поддержания микробных культур. При этом важно сохранить не только жизнеспособности клеток, но и их ценных видоспецифических характеристик.

К настоящему времени разработано большое количество методов, позволяющих хранить культуры микроорганизмов. Необходимо, однако, отметить, что не все методы одинаково пригодны для разнообразных групп микроорганизмов. Кроме того, обычно каждая культура сохраняется несколькими способами для предотвращения ее утраты в процессе хранения.

Наиболее распространенные методы сохранения микроорганизмов: периодические посевы на свежие питательные среды (субкультивирование), сохранение культур на питательных средах под слоем минерального (вазелинового) масла, хранение клеток в лиофилизированном состоянии. Реже микроорганизмы хранят при низких или сверхнизких температурах, в 1%-ном растворе хлористого натрия, на адсорбентах в высушенном состоянии и др.

Практическое занятие № 8

Вопросы для подготовки к практическому занятию

1. Периодические пересевы микробных клеток на питательные среды (субкультивирование).
2. Условия и частота пересевов микроорганизмов в зависимости от особенностей их жизнедеятельности. Поддержание клеток между пересевами. Преимущества и недостатки периодических пересевов.
3. Хранение микроорганизмов под минеральным маслом. Минеральное масло. Выбор условий для хранения микроорганизмов различных таксономических групп. Преимущества и недостатки данного метода. Хранение микроорганизмов в высушенном состоянии на адсорбентах.
4. Возможности длительного поддержания в жизнеспособном состоянии культур микроорганизмов с сохранением таксономических и других важных признаков.
5. Хранение клеток в лиофилизированном состоянии. Условия получения и хранения лиофилизированных культур. Преимущества и недостатки данного метода.
6. Защитные среды и режимы лиофилизации.

7. Хранении при низких и сверхнизких температурах. Криоконсервация. Криопротекторы и условия хранения. Преимущества и недостатки данного метода.

Лабораторная работа № 10

Ход работы

1. Ознакомиться со способами кратковременного хранения микроорганизмов.

Субкультивирование, или периодические посевы на свежие питательные среды, — один из первых способов поддержания микроорганизмов в лабораторных условиях; до сих пор широко используется в микробиологической практике.

Применение субкультивирования предполагает соблюдение следующих условий: 1) соответствующая поддерживающая среда; 2) оптимальная температура; 3) интенсивность пересевов.

В качестве *поддерживающих сред* удобнее использовать минимальные среды, замедляющие метаболические процессы в микробных клетках и тем самым способствующие увеличению времени между субкультивированиями. Однако необходимо помнить, что некоторые микроорганизмы зависят от сложных органических добавок, внесение которых в питательные среды определяет более частые пересевы.

Температура устанавливается на оптимальном для каждой культуры микроорганизмов уровне.

Интенсивность пересевов определяют опытным путем для каждого вида. Однако субкультивирование стараются проводить как можно реже для предотвращения возможности селекции нежелательных вариантов. С этой же целью осуществляют регулярный контроль чистоты хранимых культур и делают их дубликаты. При пересевах не рекомендуется использовать единичные колонии, чтобы не способствовать отбору мутантных форм. Длительные промежутки между субкультивированиями недопустимы во избежание истощения питательных компонентов и накопления в среде токсичных метаболитов.

В целом периодичность пересевов обусловлена особенностями жизнедеятельности микробных клеток, составом используемой питательной среды и внешними условиями. Многие микроорганизмы пересевают раз в 1–2 месяца, однако некоторые бактерии (например, молочнокислые) нуждаются в частых пересевах, в некоторых случаях даже через сутки. Для замедления скорости метаболических процессов микробные культуры хранят в холодильнике при 4–6 °С, что также позволяет снизить интенсивность пересевов.

Аэробные микроорганизмы чаще всего поддерживают на поверхности скошенного агара, микроаэрофилы — в полужидкой среде (0,2–0,3% агара), анаэробные микроорганизмы — в толще плотной или на дне жидкой среды.

При субкультивировании культуру засевают не менее чем в две пробирки (колбы), одну из которых используют в работе, а вторую (третью) сохраняют до следующего посева.

Хранение в 1%-ном растворе хлористого натрия удобно тем, что не требует специального оборудования и доступно любому микробиологу.

Перед хранением микроорганизмы предварительно выращиваются в оптимальных условиях. При этом рекомендуется использовать клетки, находящиеся в начале стационарной стадии роста, или сформировавшиеся покоящиеся формы — споры, цисты. Выросшую культуру сгущают центрифугированием и суспендируют в 1%-ном растворе хлорида натрия. Обязательным условием успешного сохранения жизнеспособных клеток является высокая плотность суспензии — не менее 10^8 – 10^9 клеток в 1 мл. Суспензию в стерильных пробирках или флаконах хранят в холодильнике (реже при комнатной температуре).

Подобным образом можно хранить культуры микроорганизмов, используя физиологический раствор и другие водно-солевые растворы, а в некоторых случаях и дистиллированную воду.

Метод хранения в высушенном состоянии на адсорбентах предназначен для сохранения микроорганизмов, образующих споры (актиномицеты, микроскопические грибы и анаэробные спорообразующие бактерии), потому что большинство микробных культур при высыхании погибает. В высушенных (до остаточной влажности 10–12%) клетках биохимические реакции приостанавливаются или протекают очень медленно.

В качестве адсорбентов используют почву, кварцевый песок, силикагель, вату, фильтровальную бумагу, глину, стеклянные бусы, крахмал, смолы, желатин, активированный уголь, зерна злаков и т. п. Адсорбенты призваны защищать микроорганизмы от пересыхания, связывать свободную воду и поддерживать определенный уровень остаточной влажности.

Разработанной стандартной техники данный метод не имеет. В общем виде процесс сводится к тому, что стерильный адсорбент, помещенный в ампулы (пробирки, колбы и т. п.), смешивают с густой суспензией клеток (не менее 10^8 кл/мл) и высушивают под вакуумом или при комнатной температуре. Затем ампулы запаивают (пробирки герметично закрывают) и хранят в холодильнике или при комнатной температуре. Многие гетеротрофные бактерии хранят в высушенных каплях или дисках желатина обычно при температуре -20 °С.

Один из вариантов данного метода — *L-высушивание*, или высушивание (из жидкого состояния) суспензии микроорганизмов под вакуумом в стеклянных ампулах, помещенных в водяную баню с контролируемой температурой. Преимущество метода состоит в легком хранении и транспортировке высушенных культур.

Замораживание предполагает хранение культур микроорганизмов в морозильниках или морозильных камерах холодильников при температуре

от 0 до -20°C . Использование такого простого подхода позволяет продлить срок хранения микроорганизмов до нескольких месяцев (в некоторых случаях от 6 месяцев до 2 лет). Однако данный метод не рекомендуется для криочувствительных клеток из-за их повреждения в эвтектических смесях концентрированных растворов электролитов.

2. Заложить опыт по хранению микроорганизмов, используя вышеприведенные методики.

Лабораторная работа № 11

Ход работы

1. Ознакомиться со способами долговременного хранения микроорганизмов.

Хранение под слоем минерального масла чаще всего используется для бактерий и микроскопических грибов. Этот метод обеспечивает длительную (в течение месяцев и даже лет) жизнеспособность и стабильность микробных клеток, поскольку масло препятствует пересыханию среды, а недостаток кислорода замедляет процессы метаболизма аэробных микроорганизмов.

После активного развития культуры заливают маслом: колонии аспорогенных бактерий — через 2–7 суток роста (в зависимости от вида); спорообразующие бактерии (бациллы, актиномицеты и др.) — в стадии сформировавшихся спор; дрожжи — через 4–10 суток; мицелиальные грибы — через 7–12 суток.

Наиболее удобно для использования высокоочищенное медицинское вазелиновое масло с плотностью $0,865\text{--}0,890\text{ г/см}^3$. Перед заливкой его стерилизуют в сушильном шкафу при 170°C в течение 1–2 часов. Стерилизация автоклавированием применяется реже, так как при этом возникает необходимость удаления из масла влаги (масло греют в сушильном шкафу при температуре не выше 150°C или сушат несколько суток при комнатной температуре).

Культуры заливают слоем масла не менее 1–2 см высотой над столбиком среды или верхним краем скошенного агара и сохраняют в вертикальном положении в холодильнике при $4\text{--}6^{\circ}\text{C}$ (реже при комнатной температуре).

При пересеве культуру из-под масла отбирают петлей, наклонив флакончик, и, удалив излишки масла, помещают на свежую питательную среду того же состава, что использовался при хранении. Большинство микроорганизмов при первом расеве развивается медленнее, но в дальнейшем культивировании скорость роста восстанавливается.

Метод хранения микроорганизмов под минеральным маслом удобен в работе, сокращает затраты на пересевы, обеспечивает длительную стабильность свойств микроорганизмов и не требует специального оснащения, следовательно, может применяться в любой микробиологической лаборатории.

Однако для него характерны некоторые недостатки: возможность контаминирования сохраняемых культур при недостаточной степени стерильности минерального масла; вероятность инфицирования микроорганизмами предметов и помещения в результате разбрызгивания масла при обжигании петли; сложность очистки посуды от масла.

Хранение микроорганизмов в лиофилизированном состоянии — широко распространенный, экономичный и эффективный метод длительного хранения клеток, при котором многие группы микроорганизмов могут сохранять не только жизнеспособность, но и морфологические, физиологические, культуральные признаки в течение десятков лет при условии их правильного содержания (защита от воздействия кислорода, света и влаги).

Лиофилизация (сублимация) — это высушивание под вакуумом замороженной клеточной массы, в процессе которого вода удаляется из суспензий микроорганизмов путем испарения льда, минуя жидкую фазу.

Перед лиофилизацией микроорганизмы выращивают в оптимальных условиях до достижения начала стационарной стадии развития (у спорообразующих бактерий — до формирования спор), а затем их концентрированные суспензии (10^9 – 10^{10} клеток/спор в 1 мл) помещают в специальные растворы — *защитные среды*, основное назначение которых — предохранять клетки от различных повреждений во время замораживания и высушивания. Защитные среды могут содержать индивидуальные **криопротекторы** (сыворотка крови, альбумин, обезжиренное молоко, желатин, пептон, глюкоза, сахароза, сорбит, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, глутамат натрия, аспарат натрия и др.) или их комбинации.

Суспензию клеток (спор) в защитной среде вносят по 0,2–1,0 мл в ампулы (флаконы) из нейтрального стекла, замораживают, высушивают и запаивают под вакуумом.

Для выведения клеток из состояния анабиоза после хранения создают условия, которые снижают осмотический шок и стресс, сопровождающие вскрывание ампул. При реактивации к сухим культурам по каплям добавляют стерильную (реже водопроводную) воду объемом до 1,0 мл. После регидратации клетки высевают на богатые натуральные питательные среды.

Хранение при низких и ультранизких (сверхнизких) температурах, или криоконсервация, характеризуется наибольшей универсальностью и часто используется для культур, не способных переносить лиофилизацию. Данный метод требует надежного специального оборудования и большой аккуратности при использовании жидкого азота и его паров, однако гарантирует длительное поддержание стабильного состояния сохраняемых микроорганизмов.

Микроорганизмы замораживают и хранят в рефрижераторах (от -12 °C до -80 °C) или в рефрижераторах с азотом: газовой фазы (-150 °C) либо жидкофазы (-196 °C).

Для защиты микроорганизмов от повреждающего воздействия ультранизких температур используют растворы *криопротекторов* — веществ, предотвращающих травмирование клеток при замораживании и оттаивании. Чаще всего при криоконсервации применяют 10, 15, 20% растворы глицерола; 5, 7,5, 10% растворы диметилсульфоксида; 12, 20, 24% растворы сахарозы или их комбинации.

В общем случае при подготовке культур микроорганизмов к криоконсервации используют клеточные суспензии в растворе криопротектора с высокой концентрацией клеток (10^8 – 10^{10} кл/мл). Суспензии вносят по 0,5–1,0 мл в стеклянные ампулы, пробирки Эппендорфа или во флаконы с завинчивающимися крышками. Сосуды герметично запаивают или закрывают и помещают в морозильную камеру.

При этом применяют двухэтапное снижение температуры: 1) проводят медленное охлаждение с низкой контролируемой скоростью 1 °С/мин до достижения -30°C (такой прием способствует лучшему выживанию клеток после воздействия экстремальных температур); 2) быстрое замораживание со скоростью понижения температуры 15–30 °С/мин до достижения -150°C . После этого емкости, содержащие замороженные культуры, быстро помещают в сосуды Дьюара с жидким азотом (-196°C) или его парами (-150°C).

Для восстановления жизнеспособности замороженных культур проводят их быстрое оттаивание при температуре 35–45 °С и слабом встряхивании. Быстрое нагревание замороженных культур микроорганизмов (или спор) способствует их оживлению в течение короткого срока. При этом обычно сразу после оттаивания клетки отмывают от криопротектора и высевают на богатые натуральные питательные среды.

2. Провести опыт по закладке на длительное хранение культуры микроорганизмов под слоем минерального масла.

3. Оценить успешность жизнеспособность культур после периода хранения методом посева.

Тема 5. Способы культивирования иммобилизованных микроорганизмов

Практическое занятие № 9

Вопросы для подготовки к практическому занятию

1. Основные группы носителей для иммобилизации микроорганизмов: природные и синтетические, органические и неорганические.
2. Принципы ковалентной иммобилизации.
3. Основные способы физической иммобилизации: адсорбционная иммобилизация, иммобилизация в массе носителя, мембранные технологии, системы двухфазного типа.
4. Принципы иммобилизации микроорганизмов.

5. Преимущества и недостатки иммобилизованных микроорганизмов.
6. Требования к питательным средам и условиям поддержания культур.
7. Основные технологии, использующие иммобилизованные культуры микроорганизмов.

Лабораторная работа № 12

Ход работы

а) Иммобилизация клеток микроорганизмов включением в гель альгината кальция.

Альгинат — основной структурный полисахарид бурых морских водорослей. В присутствии моновалентных катионов полисахариды даже в низких концентрациях образуют вязкий раствор, тогда как в присутствии двухвалентных катионов, особенно кальция, наблюдается образование геля. Поскольку гель образуется в мягких условиях, в нем можно иммобилизовать живые клетки. Именно это применение альгината получило наиболее широкое распространение.

Материалы и оборудование: 3% раствор альгината натрия, 0,2 М CaCl_2 , паста клеток микроорганизмов, шприц емкостью 5 мл с иглой диаметром 1 мм для формирования капель смеси или пипетка на 10 мл с диаметром выходного отверстия 3 мм

Ход работы: осторожно смешать 100 мг пасты клеток и 10 мл раствора альгината натрия. Полученную смесь поместить в шприц емкостью 5 мл и капать в сосуд, содержащий 150 мл охлажденного 0,2 М раствора CaCl_2 , таким образом, чтобы образовывались гранулы диаметром 1–2 мм. Оставить гранулы альгината кальция с включенными в них клетками в растворе CaCl_2 на 20 мин для затвердевания.

б) Иммобилизация клеток микроорганизмов включением в агар-агаровый гель.

Агар-агар — смесь полисахаридов получаемых из некоторых видов бурых водорослей. При охлаждении горячих водных растворов агар-агара образуется гель. Стабилизация геля осуществляется за счет водородных связей между отдельными молекулами полисахарида. Затвердевание геля происходит при температуре 42–35 °С. Агар-агар не изменяет кислотности среды и не производит химического повреждения клеточных структур, поэтому возможно включение живых клеток в агаровый гель без их существенного повреждения

Материалы и оборудование: Сухой агар-агар, клетки микроорганизмов, шприц емкостью 5 мл, стеклянный капилляр, мерный цилиндр емкостью 100 мл, магнитная мешалка, водяная баня, химический стакан объемом 0,5–0,8 л. Ход работы: 2 г агар-агара смешать с 50 мл дистиллированной воды нагретой до 80–90 °С.

Смесь поместить в кипящую водяную баню и перемешивать до полного растворения агар-агара. Приготовить густую суспензию клеток микроорганизмов, смешав 100 мг пасты клеток с 0,5 мл дистиллированной воды.

В химический стакан налить 0,4 л воды нагретой до 45 °С. В этот стакан поместить на 10 мин сосуды с раствором агар-агара и суспензией клеток водоросли для уравнивания их температуры. Смешать весь объем суспензии с 2 мл 4% раствора агар-агара. Затем эта смесь помещается в шприц и пропускается через охлаждаемый капилляр, в котором и осуществляется формирование тонкого цилиндра геля с заключенными в нем клетками, в мерный цилиндр с охлажденной до 10 °С водой. Процедура иммобилизации должна осуществляться быстро, чтобы избежать затвердевания геля в шприце. Иммобилизованные указанными способами клетки микроорганизмов тщательно отмыть дистиллированной (три раза с выдерживанием в каждом объеме воды по 10 мин).

После отмыва препараты поместить в сосуды, содержащие 50 мл воды, а затем в холодильник. Эти препараты используются для выполнения работы

2. Провести иммобилизацию клеток микроорганизмов приведенными способами. Определить, выделяются ли клетки в среду при легком перемешивании препаратов иммобилизованных гелей.

Тема 6. Основные типы оборудования для культивирования микроорганизмов

Теоретическая часть

Основные типы оборудования для культивирования микроорганизмов биореакторы (ферментеры) для глубинного выращивания, термостаты и шейкер-инкубаторы для создания температурных условий, а также анаэро-статы для бескислородной среды.

Основные типы оборудования включают:

Биореакторы (Ферментеры): Промышленные и лабораторные емкости для глубинного культивирования, оснащенные системами контроля температуры, рН, перемешивания и аэрации.

Термостаты: Лабораторные приборы для поддержания постоянной температуры, необходимой для роста культур.

Шейкер-инкубаторы: Оборудование, объединяющее функции термостата и перемешивания (встряхивания) для обеспечения аэрации.

Анаэро-статы: Специальные системы для выращивания анаэробных бактерий, обеспечивающие отсутствие кислорода.

СО₂-инкубаторы: Используются для создания специфической газовой среды, необходимой для чувствительных микроорганизмов.

Культуральные сосуды (лабораторная посуда): Стеклянные или пластиковые чашки Петри, колбы (встряхиваемые), пробирки, используемые для поверхностного и глубинного культивирования.

Лиофильные сушки: Применяются для длительного сохранения культур.

Выбор оборудования зависит от способа культивирования (поверхностный или глубинный) и потребностей микроорганизмов.

Практическое занятие № 10

Вопросы для подготовки к практическому занятию

1. Оборудование для культивирования микроорганизмов.
2. Аппараты для очистки воды.
3. Приборы, аппараты и реактивы для мытья и стерилизации посуды.
4. Приборы для дозирования, разведения и пробоотбора.
5. Устройства для приготовления питательных сред.
6. Культуральная посуда.
7. Боксовые помещения и ламинар-боксы.
8. Аппараты для массового культивирования клеток.
9. Помещения для микробиологических работ. Требования к ним.
10. Классы чистоты и опасности при проведении микробиологических работ.

ПРИМЕРНЫЙ ПЕРЕЧЕНЬ ТЕМ РЕФЕРАТОВ И ПРЕЗЕНТАЦИЙ

1. Ферментеры. Типы и устройство ферментеров. Особенности и проблемы культивирования клеток в биореакторах. Пенообразование и пеногашение.
2. Боксовые помещения и стерильные рабочие места. Типы конструкций, оснащение и требования к работе. Возможность использования при культивировании микроорганизмов.
3. Лабораторные термостаты, аэраторы и инкубаторы. Типы конструкций и возможности применения для разных типов микробных клеток.
4. Аппараты для массового культивирования клеток микроорганизмов. Типы, режимы работы и возможности использования для культивирования микроорганизмов.
5. Культуральная посуда. Особые требования к свойствам поверхности и материалу изделий из стекла и пластика. Специальная культуральная посуда. Области применения и возможность использования.
6. Аппараты для очистки воды, характеристика и возможности получения сверхчистой и общелабораторной воды. Приборы, аппараты и реактивы для мытья и стерилизации посуды.
7. Получение и культивирование протопластов грибов. Питательные среды и условия. Реверсия грибных протопластов.
8. Получение и культивирование бактериальных протопластов. Питательные среды и условия. Реверсия бактериальных протопластов.
9. Характеристика основных типов культуральных систем.
10. Сравнительная характеристика питательных потребностей культивируемых клеток микроорганизмов.
11. Характерные особенности качественной и количественной оценки основных параметров роста клеточной культуры.
12. Классификация способов культивирования.
13. Возможности культивирования клеток разных типов в известных культуральных системах.
14. Особенности твердофазного и жидкофазного способов культивирования клеток микроорганизмов.
15. Сравнительная характеристика периодического и непрерывного процессов культивирования клеток.

ПРИМЕРНЫЙ ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ К ЗАЧЕТУ

1. Получение накопительных и чистых культур микроорганизмов.
2. Классификация и краткая характеристика процессов культивирования микроорганизмов.
3. Культивирование микроорганизмов на твердой поверхности. Достоинства и недостатки.
4. Твердофазное культивирование. Достоинства и недостатки.
5. Жидкофазное поверхностное культивирование. Достоинства и недостатки.
6. Процессы суспензионного или глубинного культивирования. Краткая характеристика каждого способа.
7. Периодическое культивирование микроорганизмов. Особенности, возможности и недостатки.
8. Продленное периодическое оптимизированное культивирование с подпиткой.
9. Продленное периодическое оптимизированное культивирование с диализом. Диализные мембраны.
10. Диализные системы, используемые при культивировании микроорганизмов. Типы диализаторов. Электродиализ.
11. Полунепрерывное культивирование. Преимущества и недостатки периодических и полунепрерывных процессов.
12. Непрерывное культивирование. Общая характеристика хемостатных процессов.
13. Непрерывное культивирование. Общая характеристика тубулярных процессов. Достоинства и недостатки.
14. Непрерывное культивирование по принципу хемостата. Одно-, дву- и многостадийный хемостаты.
15. Непрерывное культивирование по принципу турбидостата. Достоинства и недостатки. Варианты турбидостатного культивирования.
16. Периодическое синхронное культивирование микроорганизмов. Степень и методы синхронизации.
17. Непрерывно-синхронное культивирование микроорганизмов.
18. Способы получения протопластов микроорганизмов, относящихся к различным таксономическим группам.
19. Ферментативный лизис бактериальной клеточной стенки при получении протопластов у бактерий разных групп. Особенности и возможности метода.
20. Использование факторов, подавляющих нормальный синтез основных полимеров клеточной стенки бактерий. Возможности применения у разных групп бактерий.
21. Особенности получения протопластов у грибов.

22. Регенерация клеточной стенки и реверсия к клеточным формам микробных протопластов.
23. Особенности слияния протопластов микроорганизмов. Индукторы слияния. Отбор образующихся продуктов слияния.
24. Способы культивирования анаэробных микроорганизмов. Анаэро-статы.
25. Способы хранения микроорганизмов. Общая характеристика и особенности.
26. Лиофилизация как способ хранения микроорганизмов. Достоинства и недостатки.
27. Криоконсервация как способ хранения микроорганизмов. Достоинства и недостатки.
28. Классификация питательных сред для культивирования микроорганизмов.
29. Требования, предъявляемые к питательным средам для культивирования микроорганизмов.
30. Оборудование для очистки воды.
31. Приборы и аппараты для мытья и стерилизации посуды.
32. Приборы для дозирования, разведения и пробоотбора.
33. Устройства для приготовления и стерилизации питательных сред.
34. Способы стерилизации питательных сред.
35. Помещения для работы с культурами клеток.
36. Лабораторные термостаты. Основные требования к ним и типы.
37. CO₂ — инкубаторы. Особенности использования и типы конструкций.
38. Лабораторные встряхиватели.
39. Лабораторные ферментеры. Общая характеристика, требования и классификация на основе рабочего объема.
40. Классификация ферментеров в зависимости от системы перемешивания.
41. Классификация ферментеров по способу подвода энергии.
42. Пенообразование и пеногашение при культивировании микроорганизмов в биореакторе.
43. Посуда для культивирования микроорганизмов.
44. Характерные особенности качественной и количественной оценки основных параметров роста клеточной культуры.
45. Историческое развитие техники культивирования микроорганизмов.
46. Аппараты для анаэробных процессов массового культивирования микроорганизмов.
47. Этапы выделения чистых культур микроорганизмов.
48. Классификация биореакторов по способу подачи воздуха и по конструкции.
49. Принципы составления питательных сред для микроорганизмов.
50. Источники получения культивируемых микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

Основная литература:

1. Дуктов, А.П. Микробиология: учеб. пособие для студентов учреждений высшего образования по специальности «Водные биоресурсы и аквакультура» / А.П. Дуктов, И.В. Зубовская. — Мн.: РИВШ, 2023. — 227, [1] с.: ил. — Библиогр.: с. 225–226: Словарь терминов: с. 181–224. — ISBN 978-985-586-726-6.
2. Куранова, Н.Г. Микробиология: учеб. пособие. Ч. 1: Прокариотическая клетка / Н.Г. Куранова, Г.А. Купатадзе. — 2-е изд., стер. — М.: Прометей, 2021. — 106, [2] с.: ил. — Библиогр.: с. 107. — ISBN 978-5-00172-135-2.
3. Куранова, Н.Г. Микробиология: учеб. пособие. Ч. 2: Метаболизм прокариот / Н.Г. Куранова, Г.А. Купатадзе. — М.: Прометей, 2017. — 97, [3] с.: ил. — Библиогр.: с. 98. — ISBN 978-5-906879-11-0.
4. Куранова, Н.Г. Микробиология: учеб. пособие. Ч. 3: Мир прокариот / Н.Г. Куранова, Г.А. Купатадзе. — М.: Прометей, 2020. — 117, [1] с.: ил. — Библиогр.: с. 116–117. — ISBN 978-5-00172-049-2.

Дополнительная литература:

1. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология: учебник для использования в учебном процессе образовательных организаций, реализующих программы высшего образования по специальностям 31.05.01 Лечебное дело, 31.05.02 Педиатрия, 32.05.01 Медико-профилактическое дело: в 2 т. Т. 1 / В.В. Зверев [и др.]; под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2022. — 446, [2] с.: ил., цв. ил., табл.: Авт. указ. на с. 11. — Предм. указ.: с. 436–446. — ISBN 978-5-9704-7099-2 (т. 1). — ISBN 978-5-9704-7098-5 (общ.)
2. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология: учебник для использования в учебном процессе образовательных организаций, реализующих программы высшего образования по специальностям 31.05.01 Лечебное дело, 31.05.02 Педиатрия, 32.05.01 Медико-профилактическое дело: в 2 т. Т. 2 / В.В. Зверев [и др.]; под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2022. — 468, [4] с.: ил., цв. ил., табл.: Авт. указ. на с. 12. — Предм. указ.: с. 460–468. — ISBN 978-5-9704-7100-5 (т. 2). — ISBN 978-5-9704-7098-5 (общ.)
3. Фомина, О.В. Культивирование микроорганизмов: учеб. пособие / О.В. Фомина, В.В. Лысак. — Мн.: БГУ, 2018.
4. Микробиология. Практикум: пособие / В.В. Лысак, Р.А. Желдакова, О.В. Фомина. — Мн.: БГУ, 2015.
5. Концевая, И.И. Микробиология: культивирование и рост бактерий. Практическое руководство для студ. биол. спец. вузов / И.И. Концевая. — Чернигов: Десна Полиграф, 2017.
6. Баснакьян, И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами / И.А. Баснакьян. — М.: Медицина, 1992.

Учебное издание

**КУЛЬТИВИРОВАНИЕ
МИКРООРГАНИЗМОВ**

Методические рекомендации

Составитель

КОЦУР Владимир Михайлович

Технический редактор

Г.В. Разбоева

Компьютерный дизайн

Л.В. Рудницкая

Подписано в печать 03.04.2026. Формат 60x84¹/₁₆. Бумага офсетная.

Усл. печ. л. 2,33. Уч.-изд. л. 2,12. Тираж 35 экз. Заказ 26.

Издатель и полиграфическое исполнение — учреждение образования

«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

Свидетельство о государственной регистрации в качестве издателя,

изготовителя, распространителя печатных изданий

№ 1/255 от 31.03.2014.

Отпечатано на ризографе учреждения образования

«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

210038, г. Витебск, Московский проспект, 33.