**Методические указания к выполнению лабораторных работ по курсу «Микробиология»**

**Лабораторная работа №1 Занятие 1-3.**

**Тема: Правила работы в микробиологической лаборатории. Приготовление микробиологических препаратов. Морфология микроорганизмов.**

*Цель* экспериментальной работы – Изучить правила работы в микробиологической лаборатории, основные приемы микроскопирования и приготовления микробиологических препаратов.

*Задачи*: - Ознакомиться с правилами работы в микробиологической лаборатории, техникой безопасности в микробиологической лаборатории.

- Освоить навыки микроскопирования. Изучить устройство микроскопа, основные правила микроскопирования, освоить навыки микроскопического исследования микроорганизмов.

**1. Правила работы при выполнении микробиологического практикума. Техника безопасности в микробиологической лаборатории.**

При работе в микробиологической лаборатории необходимо соблюдать определенные правила поведения. Занятие начинают со знакомства с инструкцией по технике безопасности.

В лабораторию запрещается входить в верхней одежде и класть на столы сумки, портфели и другие личные вещи. В микробиологической лаборатории разрешается работать только в халатах и косынках (шапочках), которые защищают одежду и волосы от контаминации микроорганизмами, а также препятствуют их распространению за пределы лаборатории.

В ходе работы бактериологические петли и иглы обеззараживаются прокаливанием в пламени горелки до и после отбора микроорганизмов.

В лаборатории категорически запрещается принимать пищу.

После окончания занятия рабочее место дезинфицируется, использованный материал и другие предметы сдаются лаборанту, моются с мылом руки, помещение проветривают (30-60 мин), облучают УФ - лампами.

Результаты исследований протоколируются.

2. Микроскоп. Основные правила микроскопирования. Методы микроскопического исследования микроорганизмов.

Изучение морфологии и строения клеток микроорганизмов, величины

которых измеряются микрометрами (1 мкм = 0,001 мм), нанометрами (1 нм = 0,001 мкм), ангстремами (1 А° = 0,1 нм), возможно только с помощью микроскопов.

Наиболее распространены и удобны для микробиологических исследований прозрачных объектов в проходящем свете микроскопы МБИ-1, МБР-1, БИОЛАМ 70Р (рабочий), С (студенческий), Д (дорожный).

Микроскоп имеет механическую и оптическую части.

Механическая часть микроскопа включает штатив с предметным столиком, тубус, макро- и микрометрические винты.

Оптическая часть микроскопа состоит из осветительного аппарата, объектива и окуляра.

Объектив представляет собой наиболее важную часть микроскопа. Он состоит из системы линз, заключенных в металлическую оправу, которые дают действительное увеличенное обратное изображение. В микроскопах МБР-1, БИОЛАМ используются объективы, дающие увеличение в 8, 40 и 90 раз. Увеличение объектива зависит от фокусного расстояния фронтальной линзы и, следовательно, от ее кривизны. Чем больше кривизна фронтальной линзы, тем короче фокусное расстояние и тем больше увеличение объектива. Поэтому, чем большее увеличение дает объектив, тем ниже его следует опускать над плоскостью препарата.

3. Правила приготовления микробиологических препаратов. [Техника бактериологического посева - YouTube](https://www.youtube.com/watch?v=sPYwlxUmdW8)

[Практикум по микробиологии. Введение. Микроскопирование. Препарат и простая окраска - YouTube](https://www.youtube.com/watch?v=y8DxXsWmbkk)

**Препарат «раздавленная капля»**

На чистое предметное стекло наносится небольшая капля водопроводной воды; дистиллированную воду брать не рекомендуется, так как в ней отсутствуют необходимая для микробов концентрация солей, что может вызвать изменение формы клеток, потерю ими подвижности и т. д. В каплю воды бактериологической петлей, прокаленной в пламене горелки и охлажденной, помещают исследуемый материал. Им могут служить настои мяса, рыбы, белка яйца, навоза, сена, картофеля, гороха и прочие, а также чистые культуры микроорганизмов. Препарат накрывают покровным стеклом, помещают на предметный столик микроскопа и исследуют в сухой системе.

В препарате можно найти микро-, дипло-, стрептококки, бактерии, бациллы. По характеру их движения можно предположить тип жгутикования (сами жгутики в живом препарате увидеть не удается): перитрих – кувыркающиеся движения, монотрих, лофотрих – направленное, стремительное. Споры в водном препарате отличаются от микрококков резкой очерченностью, сильно преломляют свет и кажутся блестящими или темными.

Препарат «раздавленная капля» быстро готовится, и позволяет установить форму клеток микроорганизмов, их размеры, способ спорообразования, а также наличие или отсутствие подвижности, но, к сожалению, является недолговечным.

**Приготовление фиксированного препарата**

[Приготовление фиксированного мазка и окраска по Граму - YouTube](https://www.youtube.com/watch?v=4ymW8a_mBbI)

Фиксированный препарат готовят для выявления некоторых морфологических особенностей и количественного учета, проверки чистоты культуры и ряда других целей. Такие препараты могут храниться длительное время, имеют высокую контрастность, позволяют дифференцировано выявлять клеточные структуры, кроме того, работа с ними безопасна.

Приготовление фиксированных окрашенных препаратов включает следующие этапы:

1. Приготовление мазка. На обезжиренное предметное cтекло наносят маленькую каплю водопроводной воды и переносят в нее петлей небольшое количество исследуемого материала. Полученную суспензию равномерно распределяют петлей на площади 1 – 2 кв. см возможно более тонким слоем.

2. Высушивание. Препарат высушивают при комнатной температуре на воздухе или в струе теплого воздуха высоко над пламенем горелки, держа стекло мазком вверх, не перегревая, иначе клетки микроорганизмов деформируются.

3. Фиксация. Преследует следующие цели: 1) убить микробов, 2) обеспечить лучшее прилипание мазка к стеклу, 3) сделать мазок более восприимчивым к окраске. Для фиксации сухой препарат несколько раз проводят через пламя горелки (до легкого ожога руки от прикосновения к стеклу). Для изучения строения бактериальной клетки термическая фиксация не годится, тогда используют химическую фиксацию: 1) этиловым спиртом 960 в течение 5 –20 мин, 2) смесью равных объемов этилового спирта и эфира (жидкость Никифорова) до испарения смеси, 3) жидкостью Карнуа (960 этиловый спирт + хлороформ + ледяная уксусная кислота в соотношении 6:3:1) и др.

4. Окраска. Фиксированный препарат покрывают раствором какого-либо красителя. Для получения более чистых препаратов краситель наливают на фильтровальную бумагу, покрывающую препарат. Следят, чтобы во время окрашивания раствор красителя на мазке не подсыхал. Через 1 – 3 мин мазок промывают слабой струей воды до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной. Препарат осторожно промокают фильтровальной бумагой и просматривают под микроскопом.

При простых методах окраски используют один краситель, при этом окрашивается вся клетка и хорошо видны ее формы и размеры. Сложные методы заключаются в последовательном окрашивании двумя или несколькими красителями, при этом окрашивается не вся клетка, а лишь определенные ее структуры, например ядерный аппарат. В правильно окрашенном и хорошо промытом препарате поле зрения остается светлым и чистым, а окрашенными оказываются только клетки микроорганизмов или их структуры.

**Морфология бактерий. Морфология актиномицетов и грибов**

*Цель* работы - Знакомство с морфологией бактерий, актиномицетов, грибов.

*Задачи* лабораторной работы - освоить навыки экспериментальной работы с бактериями, плесневыми грибами и актиномицетами.

Морфология бактерий.

Бактерии по форме делятся на несколько групп: сферические, цилиндрические, спиральные, необычной формы и нитчатые.

Сферические бактерии, или кокки (гр. κοκκοs - ягода, зерно), имеют округлую форму. В зависимости от расположения клеток после их деления подразделяются на группы: микро- (или моно-) кокки, диплококки, стрептококки, тетракокки, сарцины, стафилококки.

Кроме круглой формы кокки могут быть ланцетовидными, овальными, удлиненными, чечевицеобразными и др. Большинство кокков неподвижны и не образуют эндоспор.

Цилиндрическая форма (гр. Bacteria – палочка, лат. Bacillum – палочка) характерна для большинства бактерий. Палочковидные бактерии подразделяются на образующие и не образующие эндоспор.

Палочки, образующие споры, называют бациллами. Спорообразование у бактерий – способ перенесения неблагоприятных внешних воздействий. В клетке образуется только одна спора. Различают три вида спорообразования: бациллярный, клостридиальный и плектридиальный.

Спиральной формы бактерии различаются количеством и характером завитков, длиной и толщиной клеток. Их можно разделить на не гнущиеся (вибрионы – изгиб не превышает ¼ оборота спирали, спириллы – имеют один или несколько правильных витков) и изгибающиеся (спирохеты – имеют много витков, напоминают штопор).

Необычные формы бактерий морфологически разнообразны: тороидальные, звездообразные, канатоподобные, тубероидальные, червеобразные и др.

Нитчатые формы бактерий – это в большинстве случаев палочковидные клетки, которые соединяются в длинные цепочки, объединяемые слизью, чехлами или общей оболочкой.

Для определения формы бактерий, способности их к спорообразованию, подвижности достаточно исследовать их в живом состоянии на препаратах «раздавленная» и «висячая капля».

**Морфология актиномицетов**

Общим признаком актиномицетов, или ветвящихся бактерий, является способность образовывать при развитии в питательной среде мицелий толщиной 0,6 – 1,4 мкм. У одних актиномицетов мицелий хорошо развит, у других способность к его образованию выражена лишь в тенденции клеток к ветвлению и проявляется в строго определенных условиях. По строению клетки и ее химическому составу актиномицеты во многом напоминают бактерии, а по способности образовывать мицелий и строению органов плодоношения – грибы.

Колонии актиномицетов представляют собой сложную систему несептированных гиф, часть которых при росте на агаризованной среде проникают в субстрат – субстратный мицелий, а другая часть свободно ветвится в воздухе и образует на поверхности колонии пушистый, бархатистый или мучнистый налет, состоящий из гиф воздушного мицелия.

Размножаются актиномицеты обрывками мицелия или спорами, образующимися бесполым путем и располагающимися одиночно, парами, цепочками или в спорангиях.

**Морфология плесневых грибов**

Под названием «плесневые грибы» объединяют представителей различных классов грибов. Вегетативное тело грибов организовано в виде мицелия. На плотных средах плесени образуют пушистый паутинообразный налет различной окраски. Воздушный мицелий состоит преимущественно из спороносной части гриба, вегетативное тело проникает в субстрат. Плесени размножаются спорами и участками мицелия. Мицелий Фикомицетов (Mucor, Rhizopus) несептированный, на отдельных его веточках образуются спорангиеносцы с шаровидными спорангиями, наполненными эндоспорами. Мицелий Аскомицетов (Penicillium, Aspergillus) септирован, они образуют преимущественно конидиальные спороношения.

Строение колоний и мицелия, его ветвление, строение и расположение спороносцев можно изучать, просматривая колонии актиномицетов и грибов, выросшие на плотной питательной среде в чашках Петри при малом увеличении микроскопа.

**Препарат «отпечаток»**

Для знакомства с формой спор и мицелия актиномицетов и грибов делают препарат «отпечаток». Чистое покровное стекло накладывают на газон микроорганизма, слегка надавливают на него пинцетом, и тотчас же снимают, стараясь не сдвинуть в сторону. Полученный препарат помещают отпечатком вниз в каплю воды, на предметное стекло и рассматривают под микроскопом в сухой системе.

Этот препарат также удобен для изучения естественного расположения клеток в колониях микроорганизмов.

**Лабораторная работа №2 . Занятие 4-6**

**Тема . Строение бактериальной клетки**

*Цель работы –* Закрепить знания о характере спорообразования, расположения жгутиков, строении клеточной стенки, полученных на лекционных занятиях.

*Задачи работы –* Определить характер спорообразования у бациллярных форм, определить расположение жгутиков по характеру движения клеток, определить отношение микроорганизмов к окраске по Граму.

1. Определить характер движения бактерий в препарате «висячая капля».

**Препарат «висячая капля»**

«Висячей каплей» удобнее пользоваться для наблюдения подвижности микробов, их развития, размножения, прорастанием спор.

Для приготовления препарата небольшую каплю суспензии микроорганизмов наносят на покровное стекло, переворачивают его каплей вниз и помещают на специальное предметное стекло с углублением в центре.

Края лунки предварительно смазывают вазелином. Капля оказывается герметически заключенной во влажной камере, что допускает многодневное наблюдение за объектом.

1. Определить наличие спор и характер спорообразования приокрашивании бактерий методом Ожешко.
2. Определть отношение к окраске по Граму у изучаемых микроорганизмов. [4. Окраска по Граму - YouTube](https://www.youtube.com/watch?v=vbex1BZ6hb4)

Сущность метода заключается в том, что при обработке генцианвиолетом и йодом в клетках одних микроорганизмов образуется относительно устойчивый и нерастворимый в спирте комплекс, который удерживается ими при обработке спиртом. Эти микроорганизмы относят к грамположительным, они остаются окрашенными в сине-фиолетовый цвет. Грамотрицательные бактерии обесцвечиваются спиртом, и их выявляют, дополнительно окрашивая контрастной краской (водным фуксином). В основе механизма окраски по Граму лежат особенности химического состава и строения клеточных стенок бактерий.

Для окраски берут клетки молодых 18 - 24 ч. культур бактерий, так как с возрастом в бактериальной популяции увеличивается количество мертвых клеток, которые всегда грамотрицательные, а некоторые грамположительные бактерии становятся грамотрицательными (например, Lactobacillus). Окраску по Граму проводят следующим образом:

1. Готовят мазок культуры исследуемого микроорганизма на предметном стекле, который высушивают на воздухе, фиксируют жаром.

2. На препарат помещают фильтровальную бумагу и наносят раствор генцианвиолета. Экспозиция 2 мин.

3. Не смывая краски, добавляют раствор Люголя (I в KI) на 2 мин. (до почернения мазка).

4. Сливают растворы красок и препарат обесцвечивают 960 этиловым спиртом в течение 60 сек.

5. Препарат быстро, чтобы не увеличить экспозицию спирта, промывают водой.

6. Дополнительно контрастно окрашивают водным раствором основного фуксина. Экспозиция 2 мин.

7. Препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют.

В поле зрения микроскопа грамположительные бактерии сине-фиолетового цвета, грамотрицательные – красные.

Определение принадлежности бактерий к грамположительным или грамотрицательным можно проводить с помощью экспресс-анализа с 3% KOH. Для этого на предметное стекло помещают каплю раствора щелочи в которую вносят бактериологической петлей исследуемую культуру и перемешивают в течение 60 сек. Если суспензия микроорганизмов в щелочи становиться вязкой или желеобразной, то культура относится к грамотрицательным, в противном случае – к грамположительным.

**Лабораторная работа №3. Занятие 7 -9**

**Тема Методы стерилизации. Питательные среды Количественный учет микроорганизмов** [Питательные среды в микробиологии - YouTube](https://www.youtube.com/watch?v=fHnRGIPPUtw)

[Этапы культивирования микроорганизмов - YouTube](https://www.youtube.com/watch?v=qxzMUCZsrR0)

*Цель работы –* Научиться определять количество микроорганизмов методом посева на питательные среды.

*Задачи работы –* Овладеть приемами посева на питательные среды, оценки обсемененности различных поверхностей и оборудования.

Микробиологические показатели объекта, т.е. качественный и количественный состав микрофлоры, характеризуют его санитарное состояние. Поэтому надо уметь их правильно определить. Существуют два принципиально различных способа определения количества микроорганизмов: путем непосредственного подсчета микробных клеток под микроскопом и путем культивирования на питательных средах. Культивирование микроорганизмов на питательных средах может осуществляться методом титра и методом счета колоний.

Видовой состав и количество микроорганизмов на разных участках исследуемого объекта могут быть различно, поэтому для микробиологического анализа всегда отбирают среднюю пробу. Средняя проба это сравнительно небольшое количество исследуемого объекта, взятое так, что степень его обсемененности микроорганизмами соответствует среднему их количеству в единице массы или объема.

При проведении микробиологического анализа поверхности различных объектов (столов, оборудования, спецодежды и т.д.) делается смыв со 100 кв. см их поверхности. Для этого используется металлическая рамка трафарет - шаблон определенной площади. Обычно трафареты имеют вид квадрата с длиной стороны 5 см (площадью 25 кв. см), поэтому смывы берут с 4 расположенных в разных местах участков поверхности. После этого готовятся разведения, делается посев, проводится термостатирование, проводится подсчет выросших колоний и определяется обсемененность объекта. Полученная величина обсемененности сравнивается с ее максимально допустимым значением, и на основании этого делается вывод о чистоте оборудования. При проведении микробиологического анализа рук понятия средней пробы не существует. Отбор проб осуществляется со всей поверхности ладони - с ее наружной и внутренней стороны. На руках чаще всего определяют не общую обсемененность, а наличие бактерий группы кишечной палочки. В настоящее время основным показателем характеризующим обсемененность, является количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФАнМ) выражающееся в КОЕ (колоний образующих единиц) на единицу массы, объема или площади. Поскольку обсемененность определяется путем посева на питательный агар, термостатирования в течение 24 часов при температуре 36 ± 1 градус С и последующего подсчета выросших колоний.

**Лабораторная работа №4. Занятие 10-12**

**Тема Действие факторов внешней среды на микроорганизмы**

*Цель работы –* Закрепить знания о действие внешних факторов на микроорганизмов

*Задачи работы –* Определить антимикробное действие УФ-лучей и антибиотиков.

Факторы внешней среды, действующие на микроорганизмы, разделяют на физические и химические. Их эффект может быть как стимулирующим рост микробных клеток (химические вещества, используемые для поддержания жизнедеятельности, оптимальная температура и т. д.), так и угнетающим его.

Химические или физические факторы природы, полностью или частично подавляющие рост и задерживающие развитие микроорганизмов, относят к микробостатическим. Микробоцидные факторы вызывают гибель микроорганизмов. Характер действия (микробоцидный или микробостатический) зависит от природы, концентрации или дозы действующего агента, продолжительности контакта и вида микроорганизма. Химические факторы по характеру действия на клетку могут быть разделены:

● на повреждающие поверхностные структуры клетки и нарушающие проницаемость цитоплазматической мембраны (фенолы, крезолы, спирты, нейтральные мыла, поверхностно-активные вещества, некоторые антибиотики);

● повреждающие ферменты и вызывающие нарушение обмена веществ (ионы тяжелых металлов, спирты, активные окислители);

● влияющие на синтез клеточных компонентов (некоторые антибиотики, антиметаболиты). К физическим факторам, оказывающим выраженное действие на микроорганизмы, принадлежат: температура, осмотическое и гидростатическое давление, ионизирующая радиация, УФ-свет, ультразвук, механические воздействия и т. д.

Действие физических и химических факторов на микроорганизмы определяют по изменению характера их роста по сравнению с культурой, не подвергшейся воздействию. Количественные данные относительно действия факторов внешней среды на микроорганизмы можно получить только для популяции, но не для отдельных клеток.

В стерильную чашку Петри с МПА вносят каплю суспензии бактерий, которую равномерно распределяют по поверхности среды шпателем Дригальского. Затем на центральную часть сплошного газона микроорганизмов помещают стерильный трафарет с окном и открытую чашку ставят под облучатель кварцевой лампы на 20-30 мин на расстоянии 10-20 см от источника излучения. Затем трафарет убирают, чашки закрывают и инкубируют при 28 оС. Результаты опыта наблюдают через 5-7 суток. Рост микроорганизмов виден лишь на том участке агара, который был закрыт трафаретом от действия ультрафиолетовых лучей. Остальная часть среды стерильна. Губительное действие лучей зависит от расстояния, времени экспозиции и вида микроорганизма, который подвергался облучению.

Основными методами определения антибиотикочувствительности бактерий in vitro являются методы диффузии в агар (бумажных дисков).

Метод диффузии в агар основан на использовании стандартных дисков, пропитанных различными антибиотиками в определенных концентрациях (зависят от терапевтической дозы и соответствуют рекомендациям ВОЗ), стандартных питательных сред и методов. Оценка результатов связана с существованием зависимости между размером зоны подавления роста исследуемых культур вокруг дисков и значениями минимальных подавляющих концентраций (МПК) соответствующих антибиотиков (чувствительностью микроорганизмов). Имеются специальные таблицы для оценки результатов, в соответствии с которыми культуры определяют как чувствительные, умеренно устойчивые и устойчивые (резистентные) к тестируемому антибиотику.

Метод дисков не дает надежных данных при определении чувствительности микроорганизмов к плохо диффундирующим в агар полипептидным антибиотикам (например, полимиксин, ристомицин). Если эти антибиотики предполагается использовать для лечения, рекомендуется определять чувствительность методом серийных разведений.

Свежеприготовленная и подсушенная в течение 20 мин при 37 оС среда засевается равномерным слоем свежевыросшей культуры. После ее впитывания , на поверхность культуры помещают бумашные диски, чашку, не переворачивая вверх дном, осторожно переносят в термостат. Спустя 18 ч определяют активность антибиотиков по диаметру зон подавления роста тест-микроба вокруг дисков, в которых они содержались.

**Лабораторная работа № 5. Занятия 13-15**

**Микрофлора воздуха. Систематика бактерий. Практическая классификация и идентификация бактерий.**

*Цель занятий* – рассмотреть методы выделение чистых культур и познакомить с основными принципами идентификации бактерий.

*Задачи работы –*  изучить некоторые морфологические, физиолого-биохимические свойства бактерий, которые используются в практической систематике.

Методические рекомендации. О микробном загрязнении воздуха судят по микробному числу - количеству микробов содержащимся в 1м3 воздуха. Количественные микробиологические методы исследования воздуха основаны на принципах осаждения и фильтрации. Метод Коха используется для ориентировочного определения микробного числа воздуха. Чашку Петри с мясо-пептонным агаром оставляют открытой в течении I0-20 мин. Затем ее закрывают и инкубирут при 37°С. Результаты учитывают путем подсчета числа выросших колонки, исходя из того, что на площадь чаши 100 мм3 в течение 5 мин. оседают микробы, содержащиеся в 10 л, воздуха. Определение микробного числа воздуха производят по формуле Омелянского:

M = a 100 1000 5/ t b 10, где М - количество микробов в1 м3 воздуха; а - количество колонии на питательном агаре в чашке Петри; t – время опыта; в - площадь чашки Петри; 5 - время по расчету Омелянского; 100, *10 -.* площадь, объем воздуха, из которого происходит.

Идентификация бактерий. Несколько разных колонии из чашки Петри высевают в пробирки со скошенной питательной средой, и далее начиная со следующего занятия, проводят изучение пересеянных колонии. Изучают некоторые признаки: морфологию, микроскопию препаратов с целью изучения признаков необходимых для идентификации, проводят изучение культуральных и физиолого - биохимических признаков . На последнем занятии по совокупности признаков проводят определение таксономической принадлежности изучаемых культур по специально разработанной таблице Лениса.

Потомство одной клетки называют чистой культурой. Существует несколько методов получения чистых культур. Все они основаны на выделении их популяция одной единственной клетка. Наиболее старым является метод Коха, который заключается в получении чистой культуры из отдельной колонии, которую считают результатом развития одной клетки. Для получения отдельных колоний суспензию рассевают на поверхность питательной среды в чашках Петри.

Описание культуральных и физиолого-биохимических признаков. Для получения чистой культуры используют изолированные колонии, микроорганизмов, которые получены при микробиологическом анализе воздуха.

Идентификацию бактериальных культур проводят путем изучения морфологических, культуральных и фиэиолого-биохимических свойств по схеме (рис.1):

1-е занятие. Посев исследуемого материала (микрофлора воздуха) на поверхность питательной среды в чашках Петри.

2-е занятие. Характеристика изолированных колонии, посев на скошенный мясопептонный агар для накопления культуры

3-е занятие - а) Проверка чистоты культуры. б) Микроскопирование чистой культуры для проверки однородности культуры.

4 -е Пересев культуры на питательные среды для изучения культуральных и физиолого-биохимических признаков.

5-е занятие - Изучение некоторых морфологических свойств. Описание культуральных и физиолого-биохимических признаков.

Рис 1 Схема выделения и изучение чистой культуры бактерий.

Для выделения и накопления чистой культуры одну изолировавную колонию или несколько изолированных колоний пересевают в отдельные пробирки с питательной средой.

Изолированную колонию характеризуют по величине, форме, цвету, консистенции, краю, структуре и характеру поверхности, отмечают оптические свойства и профиль.

По величине колонии бывают разного размера (диаметр в мм). По форме - округлые, амебовидные, ризоидные и т.д. Цвет колоний зависит от выработки пигмента. По консистенции различают - маслянистые, пленчатые и т.д. Поверхность колоний может Сыть морщинистой, складчатой и т.д. Край колонии бывает ровным, волнистым и т.д. Колонии могут иметь аморфную, зернистую, волокнистую структуру; оптические свойства - прозрачные, матовые и.т.д. Описанные признаки колоний в дальнейшем будут использованы при определении вида. Описанную колонию отсевают в пробирку со скошенным агаром. Пробирки с посевом помещают в термостат при температуре 28 -30°С. Через несколько дней на поверхности питательной среды развивается чистая культура бактерий. Перед определением вида культуру микроскопируют, проверяют морфологическую однородность.

Изучение морфологических признаков. Определяют некоторые особенности морфологии и цитология клеток: Форму и соединение, подвижность клеток, наличие спор.

Изучение культуральных признаков. Описанные колонии дополняют описанием роста микроорганизмов по штриху на поверхности скошенной питательной среды. Отмечают интенсивность роста (скудный, умеренный, обильный) и особенности налета (сплошной, диффузный, ползучий). Характеризуют оптические свойства, поверхность, консистенции, цвет. Рост микроорганизмов в жидких питательных средах может быть скудным, обильный, умеренным, сопровождаться образованием пленки, осадка или помутнением среда. Проводят описание характера роста на ломтиках картофеля.

Изучение некоторых физиолого-биохимических признаков. По отношению к кислороду микроорганизма делятся на три большие группы; аэробы, анаэробы и микроаэрофиллы. Для описания микроорганизмов и идентификации определяют отношение выделенной культуры к кислороду. Для этого производят посев в агаризованную среду уколом, отмечают рост, интенсивность по уколу. В соответствии с этим характеризуют отношение к кислороду.

Протеолятическая активность. Производят посев культуры бактерий уколом в столбик 10-20% желатина (МПЖ). Посевы инкубируют в течении нескольких дней. При наличии протеолитических ферментов бактерий разжижают желатин, отмечают интенсивность разжижения и форму разжижения (послойное, воронковидное, пузырьчатое).

Гидролиз крахмала. Осуществляют микроорганизмы, образующие амилазу. Для выявления этой способности используют среду: пептон – 10 г, KHPO4 - 0,5 г,растворимый крахмал – 20 г, агар-агар – 20 на 1 литр воды. Выделенную культуру пересевают штрихом в чашку Петри на питательную среду. Посевы инкубируют в течение нескольких дней. Гидролиз крахмала обнаруживают по зоне просветления среды вдоль штриха.

Воздействие на молоко. Молоко содержит углеводы (лактозу), белки (казеин), витамины и минеральный соли. Рост микроорганизмов в молоке может быть связан о сбраживанием лактозы, протеолизом казеина или с двумя этими процессами одновременно. Для определения воздействия микроорганизмов на молоко производят посев культуры - засевают петлей в молоко, посев инкубируют в течении нескольких дней.

Использование лактозы с образованием кислот отмечают по изменению цвета индикатора или по образованию углекислоты, в том случае сгусток, образовавшийся в результате коагуляции казеина, пронизан пузырьками. Воздействие микроорганизмов на казеин вызывает коагуляцию, образуется сгусток или наблюдается просветление молока. Результаты работ по идентификации выделенной культуры заносят в схему:

Морфологические признаки. ,

Форма, соединение клеток.

Подвижность

Образование спор.

Культуральные признаки. Описание характера роста.

Характеристика колонии. Рисунок колонии.

Рост в мясо-пептонном бульоне.

Рост на ломтике картофеля.

Физиолого-биохимические признаки-

Отношение к кислороду.

Разжижение желатина.

Воздействие на молоко.

Гидролиз крахмала.

Рис.2 Схема описания выделенной культуры.

На основании совокупности полученных признаков, изученные организмы идентифицируют.

**Список использованной литературы**

1. Игнатова Л.В. Основы микробиологии. Алматы. «Казак университет», 2008 ,124с.