



ДОНСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
УПРАВЛЕНИЕ ДИСТАНЦИОННОГО ОБУЧЕНИЯ И ПОВЫШЕНИЯ
КВАЛИФИКАЦИИ

Кафедра «Производственная безопасность»

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ к выполнению лабораторной работы

«Методы определения количества микробных клеток»

Составитель
Киреева В.В.

Ростов-на-Дону, 2013



Аннотация

Методические указания разработаны в соответствии с учебными программами дисциплин «Физиология человека», «Биология с основами экологии», «Биотехнология» для бакалавров 1, 3 курсов направлений 280700, 110800, 080507 всех форм обучения.

Содержат изложение методов определения количества микробных клеток.

Составитель



Киреева В.В., д. биол. н., профессор





Оглавление

1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ	4
2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ.....	4
3. ПРИБОРЫ И МАТЕРИАЛЫ.....	6
4. ЗАДАНИЕ	6
5. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ.....	6
5.1. Произвести разведение исходной суспензии.....	6
5.7. Произвести рассев культуры на питательные среды.	7
5.12. Работу по подсчету клеток микробной культуры выполнить в камере Горяева-Тома.....	8
5.14. Подсчитать количество клеток по методу Виноградского-Брида.	8
6. СОСТАВЛЕНИЕ ПРОТОКОЛА ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ....	9
7. ПОДГОТОВИТЬ ОТВЕТЫ НА КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ..	10
ЛИТЕРАТУРА.....	11



1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Овладение приемами подсчета микробных клеток под микроскопом.

2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Число клеток в единице объема можно определить непосредственным их подсчетом под микроскопом и методом высева на питательные среды.

Непосредственный подсчет клеток производят в счетных камерах на фиксированных окрашенных мазках и на мембранных фильтрах.

Подсчет клеток в счетной камере применим только для подсчета достаточно крупных объектов – дрожжей, одноклеточных водорослей и некоторых крупных бактерий. Обычно для этих целей используются камеры Горяева-Тома. Камера представляет собой толстое предметное стекло, в центральной части которого нанесена сетка. Площадь большого квадрата сетки составляет $1/25 \text{ мм}^2$, глубина – $0,1-0,2 \text{ мм}$. Количество клеток в 1 мл исходной суспензии составляет:

$$M = \frac{a \cdot 1000}{h \cdot S} \cdot n \quad (1)$$

где M – число клеток в 1 мл исходной суспензии; a – среднее число клеток в квадрате сетки; h – глубина камеры, мм ; S – площадь квадрата сетки, мм^2 ; $1000 - 1000 \text{ мм}^3 = 1 \text{ мл}$; n – разведение исходной суспензии.

Подсчет клеток на фиксированных окрашенных мазках (метод Виноградского-Брида) сводится к тому, что в определен-



Методы определения количества микробных клеток

ном объеме исследуемой суспензии непосредственно под микроскопом подсчитывают количество клеток микроорганизмов.

Подсчет клеток производят с иммерсионным объективом в квадратах окулярной сетки (подсчитывают 50-100 квадратов сетки), передвигая препарат по диагонали. Рассчитывают среднее количество клеток в квадрате сетки (в поле зрения) по формуле:

$$X = \frac{\sum x}{n}, \quad (2)$$

где X – среднее количество клеток в квадрате сетки; x – количество клеток в 1 квадрате сетки; n – число квадратов сетки.

Площадь квадрата окулярной сетки (поля зрения) определяют с помощью объективного микрометра (при той же увеличении микроскопа) по формуле:

$$S = \pi r^2, \quad (3),$$

где r – радиус поля зрения.

Количество клеток микроорганизмов в 1 г или в 1 мл субстрата определяют по формуле:

$$N = \frac{x \cdot 6 \cdot 10^8 K}{S \cdot 0,05}, \quad (4),$$

где N – количество клеток микроорганизмов ; X – среднее количество клеток в квадрате сетки; S – площадь квадрата сетки , мкм^2 ; K – разведение суспензии; $6 \cdot 10^8$ – площадь мазка, мкм^2 ; 0,05 – объем взятой суспензии, мл.



3. ПРИБОРЫ И МАТЕРИАЛЫ

Микроскоп, суспензия дрожжевой культуры, предметные стекла, покровные стекла, бактериальная петля, пробирки, штатив для пробирок, счетная камера Горяева-Тома.

4. ЗАДАНИЕ

4.1. Приготовить ряд последовательных разведений исходных взвесей.

4.2. Произвести рассев культуры на плотные взвеси в чашках Петри и в жидкую среду в пробирках.

4.3. Подсчитать число клеток дрожжей в камере Горяева-Тома.

4.4. Подсчитать число клеток на фиксированных окрашенных мазках.

4.5. Сопоставить результаты, полученные при подсчете числа клеток различными методами.

5. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

5.1. Произвести разведение исходной суспензии.

Для разведения использовать 0,5 % водный раствор *NaCl*.

5.2. Стерильный раствор *NaCl* разлить стерильной пипеткой по 9 мл в стерильные сухие пробирки (5 штук).

5.3. Перенести 1 мл исследуемого материала стерильной пипеткой в пробирку с 9-ю мл раствора *NaCl*.

5.4. Тщательно перемешать полученную суспензию с по-



Методы определения количества микробных клеток

мощью новой стерильной пипетки, вбирая в пипетку и выпуская из нее полученную взвесь. Повторить процедуру 3 раза.

5.5. Этой же пипеткой взять 1 мл полученной суспензии и перенести во 2-ю пробирку с 9-ю мл раствора *NaCl* (получаем разведение 10^2).

5.6. Аналогично получить разведения 10^3 ; 10^4 ; 10^5 . Для приготовления каждого разведения обязательно используется отдельная пипетка, иначе ошибка может исказить результат в 100 и более раз. Это обусловлено адсорбцией микроорганизмов на стенках пипетки, т.е. возможностью попадания микроорганизмов со стенок пипетки в последующее разведение.

5.7. Произвести рассев культуры на питательные среды.

Стерильной пипеткой нанести 0,05-0,2 мл взвеси каждого разведения на поверхность агаровой пластины в чашке Петри.

5.8. Равномерно распределить взвесь по поверхности питательной среды стерильным шпателем.

5.9. Чашки с засеянной средой поместить в термостат при температуре 26-28 °С.

5.10. С появлением роста микроорганизмов вынуть чашки Петри из термостата и подсчитать число колоний. Чашки при подсчете не открывать. При подсчете каждую колонию помечать точкой на наружной стороне дна чашки, пользуясь стеклогграфом. При большом числе колоний дно чашки разбить на секторы. Посчитать число колоний в каждом секторе и суммировать результаты. Произвести расчет числа клеток на 1 мл или 1 г субстрата



Методы определения количества микробных клеток

та.

5.11. Определить среднее число клеток в исследуемой суспензии.

5.12. Работу по подсчету клеток микробной культуры выполнить в камере Горяева-Тома.

Для этого поместить каплю взвеси из каждого разведения дрожжевой культуры в камеру Горяева-Тома.

5.13. Произвести подсчет количества клеток в 1 мл исходной суспензии по формуле (1).

5.14. Подсчитать количество клеток по методу Виноградского-Брида.

Для этого нанести микропипеткой строго определенный объем исследуемой суспензии (0,2-0,05 мл) разных разведений на сухое обезжиренное предметное стекло, помещенное на миллиметровую бумагу с очерченной площадью 4-6-см².

5.15. Добавить к капле суспензии куплю 0,03 %-го стерильного раствора агар-агара. Быстро перемешать смесь бактериологической петлей и равномерно распределить по всей очерченной площади.

5.16. Высушить мазок на воздухе. Зафиксировать высушенный мазок 96 5-ным этиловым спиртом в течение 20-30 мин.

5.17. Окрасить зафиксированный мазок генциан-виолетом в течение 1-2 мин.



Методы определения количества микробных клеток

5.18. Промыть окрашенный мазок в кристаллизаторе с водой и высушить его на воздухе.

5.19. Произвести подсчет клеток с иммерсионным объективом по формулам (2, 3, 4).

6. СОСТАВЛЕНИЕ ПРОТОКОЛА ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

6.1. Укажите наименование и цель работы.

6.2. Опишите порядок разведения исходной суспензии.

6.3. Опишите порядок посева культуры на питательные среды. Сделайте рисунок полученного результата.

6.4. Произведите подсчет клеток микробной культуры в камере Горяева-Тома.

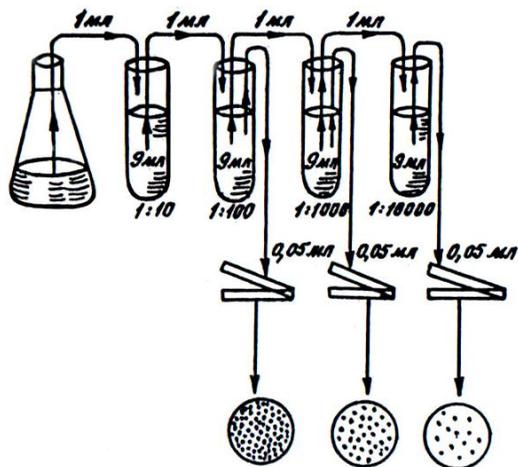


Рис. Определение количества клеток методом посева на



Методы определения количества микробных клеток

плотные среды

6.5. Произведите подсчет клеток микробной культуры по методу Виноградского-Брида.

6.6. Сделайте вывод о эффективности примененных Вами способов подсчета клеток микробной культуры.

7. ПОДГОТОВИТЬ ОТВЕТЫ НА КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

7.1. Какими методами можно определить число клеток микроорганизмов в единице объема?

7.2. Как можно определить количество клеток в единице объема непосредственным их подсчетом под микроскопом в камере Горяева-Тома?

7.3. В каких случаях используют данный способ?

7.4. Что представляет собой камера Горяева-Тома?

7.5. Как производится разведение исходной суспензии?

7.6. Как производится рассев культуры на питательные среды?

7.7. Как производится подсчет клеток на фиксированных окрашенных мазках (метод Виноградского-Брида)?



ЛИТЕРАТУРА

1. Федюкович Н.И. Анатомия и физиология человека . Ростов н/Д : Феникс. 2008. — 231 с.
2. Концепции современного естествознания / И.А. Аистов, П.А. Голиков, В.В. Зайцев. – СПб: Питер, 2005. – 205 с.
3. Биотехнология: учебник / И.В. Тихонов [и др.]; под ред. Е.С. Воронина.- СПб: ГИОРД, 2008. – 703 с.
4. Проведение лабораторно-практических работ по предмету «Микробиология» для подготовки специалистов по учебной группе профессий «Оператор биотехнологических производств». — Л., 2004. — 48 с.