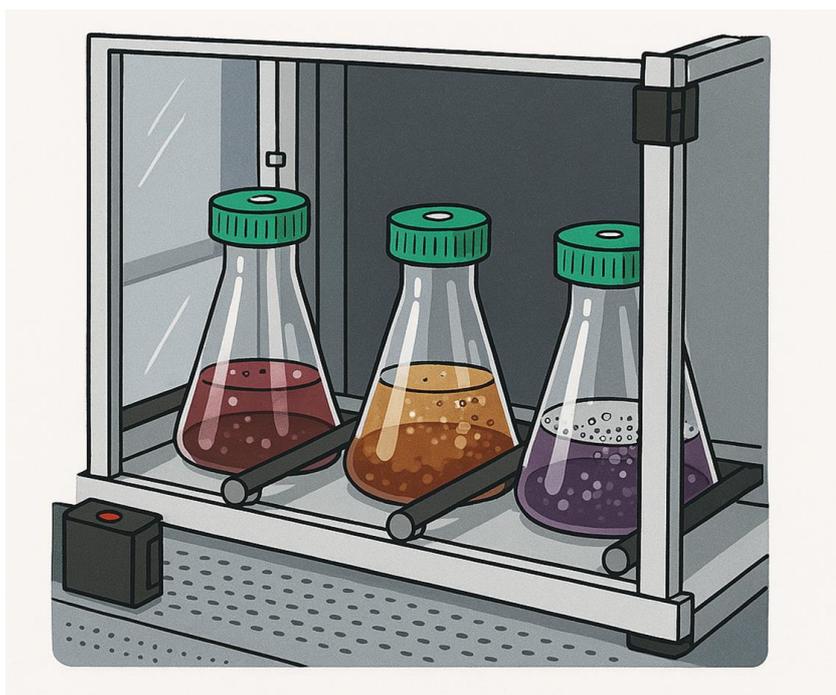


# ІТМО

**М.С. Ашихмина, А.М. Зенкин, О.О. Осьмак,  
В.С. Филозов, М.О. Володарский,  
И.С. Пантюхин, Е.В. Скорб**

## **ПРАКТИКУМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ: МЕТОДЫ РАБОТЫ С МИКРООРГАНИЗМАМИ, ОБОРУДОВАНИЕМ И АНАЛИЗОМ ДАННЫХ**



**Санкт-Петербург  
2025**

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

**М.С. Ашихмина, А.М. Зенкин, О.О. Осьмак,  
В.С. Филозоф, М.О. Володарский,  
И.С. Пантюхин, Е.В. Скорб**

**ПРАКТИКУМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ  
И БИОТЕХНОЛОГИИ: МЕТОДЫ РАБОТЫ  
С МИКРООРГАНИЗМАМИ,  
ОБОРУДОВАНИЕМ И АНАЛИЗОМ ДАННЫХ**

ПРАКТИКУМ

РЕКОМЕНДОВАНО К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ В УНИВЕРСИТЕТЕ ИТМО  
по направлению подготовки 18.03.01, 19.03.01  
в качестве практикума для реализации основных профессиональных  
образовательных программ высшего образования бакалавриата

**ИТМО**

Санкт-Петербург  
2025

Ашихмина М.С., Зенкин А.М., Осьмак О.О., Володарский М.О., Филозоф В.С., Пантюхин И.С., Скорб Е.В. Практикум по микробиологии и биотехнологии: методы работы с микроорганизмами, оборудованием и анализом данных – СПб: Университет ИТМО, 2022. – 40 с.

Рецензент(ы):

Яковченко Наталья Владимировна, кандидат технических наук, доцент (квалификационная категория "ординарный доцент") факультета биотехнологий, Университета ИТМО.

Данное учебно-методическое пособие предназначено для студентов и исследователей в области микробиологии и биотехнологии. внимание уделено основному оборудованию для работы с чистыми культурами: подробно описаны принципы работы ламинарных боксов разных классов, автоклавов, планшетных спектрофотометров и дозирующих систем. Отдельный раздел посвящен правилам планирования и постановки экспериментов, включая подготовку питательных сред, расчет серийных разведений и интерпретацию полученных данных.

Нарушение правил эксплуатации и техники безопасности является ответственностью организации-пользователя.

The logo of ITMO University, consisting of the letters 'ITMO' in a bold, black, sans-serif font. The letter 'I' is stylized with a vertical line extending upwards from its top.

ИТМО (Санкт-Петербург) — национальный исследовательский университет, научно-образовательная корпорация. Альма-матер победителей международных соревнований по программированию. Приоритетные направления: IT и искусственный интеллект, фотоника, робототехника, квантовые коммуникации, трансляционная медицина, Life Sciences, Art&Science, Science Communication.

Лидер федеральной программы «Приоритет-2030», в рамках которой реализовывается программа «Университет открытого кода». С 2022 ИТМО работает в рамках новой модели развития — научно-образовательной корпорации. В ее основе академическая свобода, поддержка начинаний студентов и сотрудников, распределенная система управления, приверженность открытому коду, бизнес-подходы к организации работы. Образование в университете основано на выборе индивидуальной траектории для каждого студента.

ИТМО пять лет подряд — в сотне лучших в области Automation & Control (кибернетика) Шанхайского рейтинга. По версии SuperJob занимает первое место в Петербурге и второе в России по уровню зарплат выпускников в сфере IT. Университет в топе международных рейтингов среди российских вузов. Входит в топ-5 российских университетов по качеству приема на бюджетные места. Рекордсмен по поступлению олимпиадников в Петербурге. С 2019 года ИТМО самостоятельно присуждает ученые степени кандидата и доктора наук.

© Университет ИТМО, 2025

© Ашихмина М.С., Зенкин А.М., Осьмак О.О., Володарский М.О., Филозоф В.С., Пантюхин И.С., Скорб Е.В. 2025

## Содержание

1 Основное оборудование для работы с чистыми культурами .....	5
1.1. Оборудование для работы в асептических условиях .....	5
1.2. Стерилизационное оборудование .....	12
1.3. Планшетный спектрофотометр .....	14
1.4 Дозирующая пипетка.....	17
2. Построение плана исследований.....	21
2.1 Работа с научной литературой.....	22
2.2 Работа с научными базами данных .....	24
2.3 Оптимизация поиска научной литературы .....	25
2.4 Обработка и систематизация литературных данных .....	26
3. Лабораторный практикум.....	29
3.1 Проверка стерильности рабочего пространства: смывы на чистоту в ламинарном боксе .....	29
3.2 Основы бактериального посева: методы и техника выполнения .....	30
3.3 Метод серийных разведений: получение изолированных колоний .....	34
3.4 Приготовление и инокуляция ночной культуры бактерий.....	35
3.4.1 Использование минимальных питательных сред в изучении физиологии микроорганизмов.....	35
3.5 Измерение роста молочнокислых бактерий методом спектрофотометрии .....	36
Полезные ссылки .....	38

## **Введение**

Современная микробиология и биотехнология представляют собой динамично развивающиеся области науки, играющие ключевую роль в решении актуальных задач медицины, сельского хозяйства, экологии и пищевой промышленности. Развитие этих дисциплин позволяет создавать инновационные биопрепараты, разрабатывать экологически безопасные технологии производства и решать глобальные проблемы современности, такие как обеспечение продовольственной безопасности и охрана окружающей среды. В связи с этим подготовка квалифицированных специалистов в области биотехнологии требует комплексного подхода, сочетающего фундаментальные теоретические знания с практическими навыками работы в лаборатории и владением современными методами исследований.

Настоящее методическое пособие предназначено для студентов бакалавриата, обучающихся по дисциплинам: "Биохимия", "Молекулярно-генетические подходы в биотехнологии" и "Биотехнология микроорганизмов и микробиологический синтез". Его цель — сформировать у обучающихся целостное представление о физиологических и биохимических процессах в микробных клетках, а также освоить ключевые методы их изучения. Особое внимание уделяется развитию практических навыков: планированию экспериментов, работе с лабораторным оборудованием, анализу и интерпретации полученных данных.

Пособие структурировано таким образом, чтобы обеспечить поэтапное освоение материала — от теоретических основ до их практического применения. Каждый раздел включает подробные методические указания по проведению лабораторных работ, что позволяет студентам не только закрепить полученные знания, но и приобрести опыт самостоятельной исследовательской деятельности. Для успешного освоения курса необходимы базовые знания в области биологии, химии и биохимии, а также понимание принципов работы в биотехнологической лаборатории.

Использование данного пособия в учебном процессе способствует формированию у студентов профессиональных компетенций, необходимых для проектирования и оптимизации биотехнологических процессов, выбора современных методов анализа и решения прикладных задач в области биотехнологии. Материал предназначен как для аудиторной работы, так и для самостоятельного изучения, что обеспечивает гибкость в освоении дисциплины и способствует развитию навыков критического мышления и аналитического подхода к исследовательской деятельности.

## **1 Основное оборудование для работы с чистыми культурами**

### **1.1. Оборудование для работы в асептических условиях**

В лабораторной практике используются различные типы защитных устройств, которые часто называют по-разному: биобезопасные боксы, микробиологические шкафы, ламинарные боксы (укрытия) и т. д. Несмотря на схожую конструкцию, эти приборы имеют принципиальные отличия в функциональном назначении и уровне защиты.

Ламинарные боксы предназначены исключительно для защиты рабочего процесса от внешних загрязнений. Они создают однонаправленный поток стерильного воздуха, который проходит через HEPA-фильтр, но не обеспечивают защиту оператора или окружающей среды. Поскольку отработанный воздух выводится наружу без дополнительной очистки, в таких боксах нельзя работать с патогенами, токсичными веществами или радионуклидами, так как это может представлять опасность для персонала.

С другой стороны, боксы биологической безопасности (далее БББ) могут обеспечивать комплексную защиту как объект, так и работника. БББ позволяют изолировать опасные агенты, предотвращая их попадание в окружающую среду и защищая оператора. Также некоторые боксы могут быть подключены к системе вытяжной вентиляции, что позволит предотвратить возможность заражения персонала и контаминации воздуха рабочей зоны и окружающей среды

В зависимости от конструкции и уровня безопасности БББ разделяют на три класса согласно стандарту EN 12469:2000 (ГОСТ Р EN 12469).

Боксы биологической безопасности I класса защиты представляют собой вентилируемые рабочие камеры с частично открытой фронтальной зоной, через которую оператор взаимодействует с материалом. Их ключевая функция – защита персонала и окружающей среды от потенциально опасных биологических агентов.

Защита обеспечивается за счет направленного воздушный потока, то есть воздух затягивается внутрь бокса через рабочее окно, создавая барьер для выхода поток из внутренней камеры. Как правило, в боксе установлены фильтры HEPA (класс H14) – перед выбросом наружу воздух проходит через высокоэффективный фильтр, задерживающий  $\geq 99,5\%$  частиц размером от 0,3 мкм, включая бактерии и вирусы. При этом очищенный воздух после фильтрации потока либо выбрасывается в помещение (если допустимо по нормам), либо подключается к вытяжной системе.

Стоит отметить ограничения применения использования БББ I класса - нет защиты образца, поскольку воздух из лаборатории свободно поступает в рабочую зону, возможна контаминация объектов. Запрещено работать с особо опасными патогенами (например, возбудителями COVID-19, туберкулеза) из-за риска утечки при резких движениях оператора. Также требуется строгое соблюдение техники работы, так как скорость входящего

потока (обычно 0,7–1,0 м/с) должна быть достаточной для предотвращения обратного выброса.

Боксы биологической безопасности II класса типа А2 – это более усовершенствованные системы, обеспечивающие одновременную защиту оператора, окружающей среды и самого образца (объекта). Создаются стерильные условия внутри рабочей камеры, что позволяет предотвратить контаминацию обрабатываемого материала.

Защита оператора (работника) обеспечивается за счет затягивания воздуха через фронтальное окно (обычно со скоростью 0,5–0,6 м/с), формируя воздушную завесу, которая предотвращает выход воздуха из рабочего пространства наружу. Обычно в таких боксах около 70% воздуха рециркулируется через HEPA-фильтр, а 30% выбрасывается после дополнительной очистки.

Во внутренней (рабочей) камере ламинарный нисходящий поток (скорость ~0,3–0,5 м/с) создается после прохождения воздуха через второй HEPA-фильтр, расположенный над рабочей зоной. Такой поток минимизирует перекрестную контаминацию между образцами, в отличие от турбулентного (ISO 14644-1:2015). Для обеспечения очистки воздуха, как входящего, так и выбрасываемого, в боксе устанавливаются HEPA-фильтры класса H14, что обеспечивает защиту при работе с вирусами и бактериями.

Однако, несмотря на дополнительную фильтрацию, боксы типа А2 имеют ограничения. Они не подходят для работы с летучими токсинами и радионуклидами, так как рециркуляция воздуха может привести к их накоплению в рабочей камере.

Боксы биологической безопасности II класса типа В2 обеспечивают защиту от биологических агентов, а также безопасные условия для работы с токсичными химическими веществами и радионуклидами. Их ключевая особенность — отсутствие рециркуляции воздуха, что делает их незаменимыми в специализированных лабораториях. Такие условия обеспечиваются за счет удаления всего воздуха из рабочей камеры после прохождения через HEPA-фильтр. Такой подход исключает накопление летучих соединений, что позволяет работать с канцерогенами, токсичными веществами, радионуклидами.

Важной особенностью таких боксов является подключение к вытяжной системе с отрицательным давлением. При этом вытяжная система не может быть подключена в общую систему вентиляции.

Боксы биологической безопасности III класса представляют собой полностью герметичные системы, обеспечивающие абсолютную защиту при работе с наиболее опасными биологическими материалами. Их

конструкция исключает любой контакт оператора с содержимым рабочей камеры во время работы, что делает их незаменимыми в лабораториях, работающих с возбудителями смертельных заболеваний.

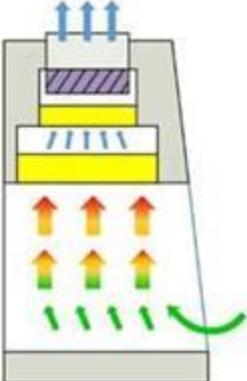
Конструкция бокса предусматривает отделение рабочей зоны от оператора герметичными перчатками и непрерывным корпусом. Вся работа осуществляется исключительно через встроенные перчаточные порты. Внос материалов (образов) осуществляется через двухдверный передаточный шлюз с дезинфекционной камерой.

Как и в БББ II класса, боксы III класса оснащены HEPA-фильтрацией. Однако на вход в рабочую камеру установлена двойная система HEPA-фильтров (класс H14). В камере устанавливается нисходящий ламинарный поток (0,3–0,5 м/с). Отработанный воздух подвергается двухступенчатой очистке. Первый этап – HEPA-фильтр, который задерживает биологические агенты. Далее устанавливается второй фильтр (угольный или ULPA), который задерживает химические загрязняющие вещества.

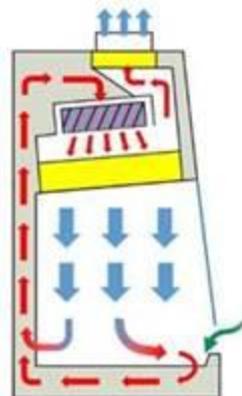
Боксы III класса обеспечены дополнительной системой безопасности. Создается непрерывное отрицательное давление не менее 120 Па. Рабочая камера имеет автоматическую дезинфекцию паром, газом или химическими средствами. Также предусмотрена система аварийного питания для поддержания работы в критических ситуациях.

При работе с боксами III класса следует также соблюдать эксплуатационные требования:

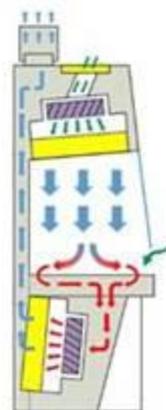
- Обязательное подключение к автономной вентиляционной системе
- Регулярная проверка герметичности (тест с химическими индикаторами)
- Ежедневный контроль параметров воздушных потоков
- Обязательное использование дополнительных СИЗ даже при работе с исправным боксом.

Название и класс бокса	Внешний вид
Бокс биологической безопасности I класс	

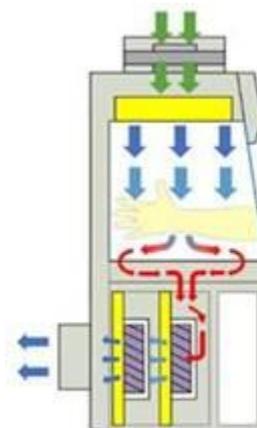
Бокс биологической безопасности  
II класс типа A2



Бокс биологической безопасности  
II класс типа B2



Бокс биологической безопасности  
III класс



---

Основные компоненты ламинарного бокса:

1. HEPA-фильтр (High Efficiency Particulate Air): основной элемент очистки воздуха, задерживающий 99,97% частиц размером от 0,3 мкм (бактерии, споры, пыль).

2. Вентиляционная система: включает вентилятор, создающий равномерный ламинарный поток воздуха.

3. УФ-лампа: используется для дополнительной дезинфекции рабочей зоны перед и после работы.

**Важно:** УФ-излучение опасно для кожи и глаз – во время работы лампы бокс должен быть закрыт.

Принцип работы: в ламинарном боксе создается стерильная рабочая зона благодаря системе принудительной подачи очищенного воздуха. Вентиляционная система забирает воздух из помещения и последовательно пропускает его через систему фильтрации. Сначала воздух проходит предварительную очистку через грубый фильтр, удаляющий крупные частицы, затем через высокоэффективный HEPA-фильтр (класса H14), который задерживает до 99,97% микрочастиц размером от 0,3 микрона, включая бактерии, споры и вирусы.

Очищенный воздух подается в рабочую камеру строго направленным ламинарным (безвихревым) потоком. В зависимости от конструкции поток может быть вертикальным (сверху вниз) или горизонтальным (от задней стенки к оператору). Этот постоянный воздушный поток создает избыточное давление в рабочей зоне, что предотвращает проникновение внешних загрязнений. Одновременно он вымывает из рабочей зоны любые частицы, которые могут попасть туда при открытии фронтального стекла или во время манипуляций с материалами.

### **Работа в ламинарном боксе:**

#### *1. Подготовка к работе*

1.1 Возьмитесь за специальную ручку дверцы, расположенной ниже стекла.

1.2 Плавно сдвиньте дверцу, опустите ее (необходимо делать это аккуратно, так как на обратной стороне дверцы расположена УФ-лампа) и задвиньте дверцу.

1.3 Протрите рабочие поверхности 70% этанолом или другим дезинфицирующим средством.

1.4 Аккуратно выдвиньте дверцу из-под ламинарного бокса, приподнимите ее и закройте.

1.5 Возьмите магнитный ключ, найдите панель управления в правой верхней части ламинарного бокса.

1.6 Вставьте магнитный ключ в специальное гнездо для разблокировки клавиатуры.

1.7 Нажмите кнопку "UV".

1.8 Выставьте на цифровой панели время работы УФ-лампы 10–15 минут для очистки воздуха перед началом работы.

1.9 Еще раз нажмите кнопку "UV" для начала работы лампы.

1.10 После окончания работы УФ-лампы поднесите магнитный ключ к гнезду, после разблокировки системы нажмите на кнопку «L» для включения света.

1.11 Слегка отодвиньте дверцу, оставляя небольшую щель между стеклом и дверцей.

1.12 Нажмите кнопку «F» для начала подачи стерильного воздуха.

1.13 Нажмите на кнопку «Звук» для выключения звука.

1.14 Аккуратно опустите дверцу ламинарного бокса и задвиньте ее.

1.15 Дождитесь окончания регулирования потока воздуха (загорится зеленая кнопка на панели управления и боковая лампочка справа перестанет мигать красным).

---

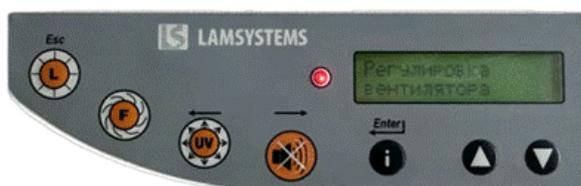
Магнитный ключ



Разблокировка  
клавиатуры



Клавиатура/панель



UV (ультрафиолет)



Включение света



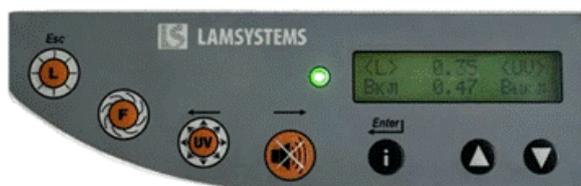
Включение  
ламинарного  
потока



Отключение звука



Ламинар готов к  
работе



## 2. Рабочий процесс:

- 2.1 Наденьте перчатки.
- 2.2 Перед тем, как внести руки в ламинарный бокс, обработайте их 70% этанолом (после этого запрещается трогать посторонние предметы).
- 2.3 Все инструменты и материалы должны быть стерильными.

## 3. Завершение работы:

- 3.1 Уберите все материалы, протрите поверхности дезинфицирующим раствором.
- 3.2 Выдвиньте дверцу, приподнимите ее, оставляя небольшую щель между стеклом и дверцей.
- 3.3 Возьмите магнитный ключ, поднесите его к гнезду и разблокируйте систему.
- 3.4 Нажмите кнопку «F» для выключения потока.
- 3.5 Закройте дверцу до конца.

- 3.6 Нажмите кнопку «L» для выключения света.
- 3.7 Нажмите кнопку «UV» для стерилизации на 15–20 минут.

**!Важно:** если во время работы у вас заблокировалась панель управления – поднесите еще раз магнитный ключ к гнезду. Если вы вынесли руки из ламинарного бокса – руки необходимо повторно обработать спиртом перед следующим внесением внутрь.

## 1.2. Стерилизационное оборудование

Автоклавы (паровые стерилизаторы) – это устройства, предназначенные для стерилизации оборудования, инструментов и сред с использованием насыщенного водяного пара под давлением. Автоклавы работают по принципу увлажненного тепла (насыщенного пара при повышенном давлении). Автоклавирование обеспечивает денатурацию и коагуляцию белков микроорганизмов, включая бактерии, грибки и их споры, что делает его одним из самых надежных способов уничтожения биологической контаминации. Эффективность стерилизации в автоклаве определяется сочетанием температуры, давления и времени обработки.

### Работа на паровом стерилизаторе TM-XD24D



Ключевые параметры стерилизации: температура 121–134 °С, давление 1–3 атм, продолжительность выдержки 15–30 минут (при 121 °С) или 3–10 минут (при 134 °С).

Выбор режимов обусловлен несколькими причинами. Например, при температуре 121 °С белки микробных клеток денатурируют, что приводит к разрушению мембраны, включая стойкие спорообразующие бактерии. Для стерилизации инструментов без упаковки используется более высокотемпературный режим: 134 °С, 6 минут. Такая обработка позволяет быстро и эффективно обеззаразить металлические поверхности и стеклянную посуду. Однако, если инструменты находятся в упаковке (например, в крафт-пакетах или контейнерах), применяется более щадящий

режим: 126 °С, 15 минут, который обеспечивает проникновение пара внутрь упаковки без риска повреждения содержимого.

Отдельный режим предусмотрен для стерилизации лабораторной одежды. Тканевые материалы требуют деликатного подхода, так как избыточная температура или длительное воздействие пара могут ухудшить их структуру.

Некоторые режимы, особенно предназначенные для стерилизации инструментов (как в упаковке, так и без нее), включают дополнительную функцию сушки. Это позволяет предотвратить образование конденсата, который может способствовать повторному загрязнению стерильных предметов.

Работа с автоклавом требует строгого соблюдения последовательности действий. Перед началом процесса необходимо проверить уровень воды и исправность уплотнительных элементов. После завершения цикла стерилизации важно дождаться снижения давления до безопасного уровня (около -6,0 кПа), прежде чем открывать камеру. При извлечении стерилизованных предметов следует использовать термостойкие перчатки и избегать контакта с горячими металлическими поверхностями. Также недопустимо резкое охлаждение стерилизованных питательных сред, например, помещением их под холодную воду, так как это может привести к конденсации влаги и изменению их свойств.

Ход работы:

1. Подготовка автоклава
  - Откройте крышку, потянув ручку на себя.
2. Загрузка материалов
  - Разместите подготовленные инструменты/материалы на перфорированном лотке.
  - Инструменты должны лежать в один слой.
  - Между предметами оставьте зазоры 3–5 мм для равномерного прогрева.
3. Выбор режима работы
  - На панели управления выберите нужный режим стерилизации (в соответствии с инструкцией) – инструменты без упаковки/упакованные инструмент/питательные среды/одежда.
4. Закрытие крышки
  - Плавно закройте крышку до характерного щелчка.
  - Убедитесь в герметичности (крышка должна плотно прилегать).
5. Проверка уровня воды
  - На цифровом экране отображается уровень воды.
  - Нормальный уровень – "HIGH".
  - Если уровень ниже "LOW":
    - Откройте заливную горловину (на крышке устройства справа).

- Медленно долейте дистиллированную воду до отметки "HIGH" (объем бака 5 л).

- Не используйте обычную воду (вызывает накипь).

#### 6. Запуск автоклава

- Нажмите кнопку старта.

- Если воды недостаточно, автоклав приостановит работу и подаст звуковой сигнал. В этом случае:

- Долейте воду до уровня "HIGH".

- Продолжите работу.

#### 7. Процесс стерилизации

- Происходит нагрев камеры, повышение температуры и давления.

- Давление и температура поддерживаются автоматически в соответствии с выбранным режимом.

#### 8. Завершение цикла

- После основной стерилизации:

- Происходит охлаждение камеры и сброс давления.

- Включается режим сушки.

#### 9. Открытие автоклава

- Дождитесь, пока температура упадет до 70–80 °С (это отобразится на экране).

- Потяните ручку, плавно откройте крышку.

#### 10. Извлечение инструментов

- Используйте термостойкие перчатки, чтобы избежать ожогов.

- Дайте инструментам окончательно остыть перед использованием.

### 1.3. Планшетный спектрофотометр

Спектрофотометрия – это метод анализа, основанный на измерении поглощения света веществом в зависимости от длины волны. Планшетный спектрофотометр (ридер) представляет собой специализированный прибор, предназначенный для измерения оптической плотности образцов, размещенных в 96-луночном планшете.

Основной принцип работы заключается в пропускании монохроматического света через исследуемый образец и регистрации степени его поглощения. Согласно закону Бугера – Ламберта – Бера, оптическая плотность (*Absorbance*, *A*) прямо пропорциональна концентрации вещества (*c*), длине оптического пути (*l*) и молярному коэффициенту экстинкции (*ε*):

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Современные планшетные спектрофотометры, такие как Mindray MR-96A, представляют собой сложные аналитические приборы, состоящие из нескольких ключевых компонентов. В их основе лежит источник света, чаще всего галогеновая или ксеноновая лампа, которая обеспечивает широкий спектр излучения. Далее свет проходит через монохроматор или

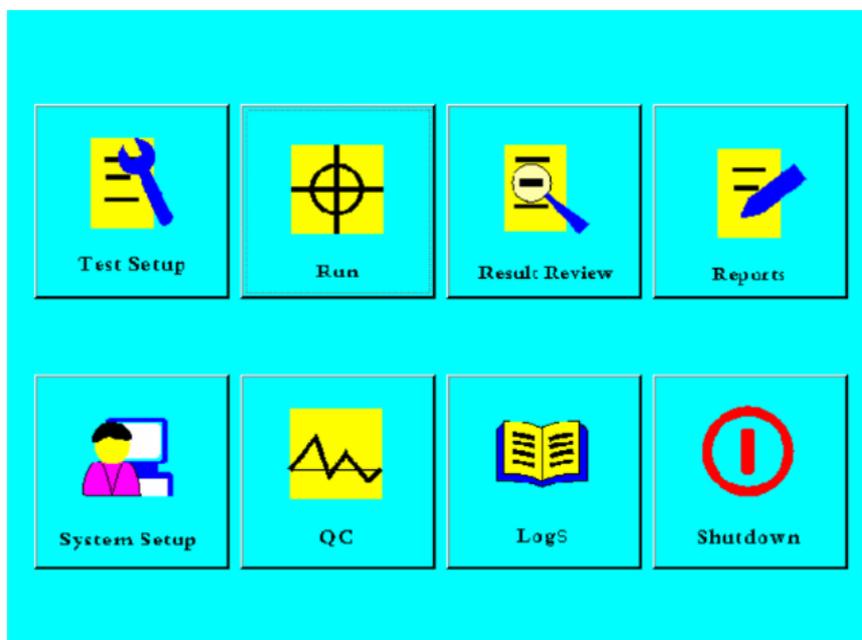
интерференционные фильтры, которые позволяют выделить из него определенную длину волны, необходимую для измерения.

Оптическая система, состоящая из линз и зеркал, направляет сформированный пучок света через лунки планшета, в которых находятся пробы. После взаимодействия с образцом свет попадает на детектор – это может быть фотодиод или ПЗС-матрица, регистрирующая интенсивность прошедшего излучения. Полученные данные обрабатываются встроенным программным обеспечением, которое не только управляет процессом измерений, но и анализирует, сохраняет и визуализирует результаты.

Один из самых распространенных методов анализа на Mindray MR-96A – иммуноферментный анализ (ELISA, ИФА), позволяющий определять концентрации антител, антигенов и гормонов в биологических образцах. Кроме того, можно проводить кинетические исследования, в том числе измерение активности ферментов. Одной из важных сфер применения спектрофотометра в микробиологии и биотехнологии являются клеточные анализы. С их помощью оценивают жизнеспособность клеток.

## Порядок подготовки и проведения измерений на Mindray MR-96A

Перед использованием прибора убедитесь, что он подключен в сеть, после чего нажмите на задней панели прибора кнопку включения. Для удобного пользования лучше использовать стилус, который расположен на правой боковой панели.



Для создания протокола измерения на главном экране нажмите “test setup”, затем в появившемся меню выберите кнопку “Add” и перейдите в настройки параметров измерения.

Basic Parameters

Test:  Reagent:  Blank <=

Full Name:  Pri Wave:   Dual Samples

Calc Mode:  Sec Wave:

---

Qualitative Parameters

CutOff =  \* NC +  \* PC +  \* CoCtrl +

NC Range:  ..  PC Range:  ..

Qual Mode:  Neg:   s/co Pos:   s/co

---

Quantitative Parameters

Nr of Stds:  S1:  S2:  S3:  S4:

Unit:  S5:  S6:  S7:  S8:

Dual Stds k:  b:  Reference:  ..

OK Cancel

Используя только верхнюю часть - “Basic Parametrs”, укажите название теста (протокола), выставите необходимую длину волны (в зависимости от проводимого эксперимента) из выпадающего списка в поле “Pri Wave”. В поле “Calc Mode” выберите из выпадающего списка “absorbance”. Сохраните тест кнопкой “OK”.

Вернитесь в главное меню и нажмите “Run”, вы переместитесь в меню настройки образца.

Move Mode:  Step  Conti

Place Mode:  Hor  Ver

Shaking: Speed  Time

Sample Blank NC- PC+ CoCtrl STD QC Del

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

A											
B											
C											
D											
E											
F											
G											
H											

Test:  Calc Mode:

New All Clear Start Return

В левом нижнем углу нажмите кнопку “New” и выберите созданный тест, далее нажмите на “Blank” и выберите пустую лунку планшета, “PC+”, где будет положительный контроль, если его нет, то можно его установить также на пустую лунку, аналогично для “NC-”. Теперь нажмите на кнопку

“Sample” и нажмите на все положения, в которых присутствуют образцы, которые мы собираемся измерить. После чего мы можем поместить 96-луночный планшет в прибор, необходимо открыть крышку прибора, снять крышку с планшета и поместить его внутрь. Ячейка A1 должна находиться в левом верхнем углу. Закройте крышку и нажмите на кнопку “Start”.

После проведения измерения на экране отобразится результат:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 -	2 +	3 +	4 +	5 -	6 -	7 -	8 -	9 -	10 -	11 -	12 -
	-0.815 -7.760	0.154 1.470	0.249 2.375	1.544 14.706	0.039 0.371	-0.045 -0.426	-0.061 -0.579	0.010 0.094	-0.004 -0.040	-0.026 -0.252	-0.100 -0.952	-0.087 -0.827
B	13 +	14 -	15 -	16 -	17 -	18 -	19 -	20 -	21 -	22 -	23 -	24 -
	0.140 1.332	-0.028 -0.267	-0.008 -0.078	-0.020 -0.187	-0.085 -0.807	-0.117 -1.110	-0.101 -0.961	-0.034 -0.322	-0.050 -0.472	-0.114 -1.088	-0.141 -1.341	-0.137 -1.307
C	25 +	26 +	27 +	28 -	29 -	30 -	31 -	32 -	33 -	34 -	35 -	36 -
	1.219 11.607	0.859 8.178	0.444 4.231	0.082 0.779	-0.078 -0.747	-0.091 -0.864	-0.061 -0.579	-0.047 -0.446	-0.057 -0.545	-0.116 -1.106	-0.103 -0.983	-0.091 -0.870
D	37 +	38 -	39 -	40 -	41 -	42 -	43 -	44 -	45 -	46 -	47 -	48 -
	0.143 1.364	0.018 0.167	-0.013 -0.120	-0.101 -0.958	-0.138 -1.319	-0.114 -1.089	-0.040 -0.385	-0.052 -0.497	-0.124 -1.185	-0.152 -1.448	-0.123 -1.169	-0.043 -0.406
E	49 +	50 -	51 -	52 -	53 -	54 -	55 -	56 -	57 -	58 -	59 -	60 -
	0.160 1.521	0.007 0.067	-0.042 -0.399	-0.118 -1.127	-0.134 -1.275	-0.113 -1.072	-0.067 -0.634	-0.074 -0.709	-0.149 -1.415	-0.136 -1.292	-0.087 -0.826	-0.061 -0.585
F	61 +	62 +	63 +	64 +	65 +	66 +	67 +	68 +	69 +	70 +	71 +	72 +
	0.636 6.061	0.909 8.656	0.590 5.615	0.401 3.823	0.544 5.183	0.679 6.471	0.746 7.108	0.581 5.532	0.406 3.863	0.522 4.971	0.796 7.579	0.668 6.359
G	73 +	74 -	75 -	76 -	77 -	78 -	79 -	80 -	81 -	82 -	83 -	84 -
	0.155 1.472	0.022 0.213	-0.085 -0.808	-0.105 -1.002	-0.080 -0.761	-0.036 -0.342	-0.049 -0.471	-0.121 -1.149	-0.121 -1.156	-0.079 -0.754	-0.047 -0.445	-0.132 -1.253
H	85 +	86 -	87 -	88 -	89 -	90 -	91 -	92 -	93 -	94 -	95 -	96 -
	0.179 1.703	0.041 0.393	-0.038 -0.365	-0.040 -0.377	0.015 0.138	0.002 0.021	-0.043 -0.414	-0.071 -0.676	-0.058 -0.552	0.000 0.003	-0.006 -0.056	-0.055 -0.527

Для печати результата нажмите на кнопку “Print”, для сохранения “Save”, если же результат нам не пригодится, то можно нажать “Return”, лучше сохранять все результаты, чтобы в будущем можно было к ним обратиться.

## 1.4 Дозирующая пипетка

Пипетка-дозатор – это инструмент для точного отбора и дозирования жидкостей в лабораторных условиях. Представляет собой механическое или электронное устройство с регулируемым/фиксированным объемом, работающее по принципу плунжерного насоса.

### Виды пипеток-дозаторов

#### 1. Пипетки постоянного объема

- Имеют фиксированный объем (например, 1 мл, 5 мл, 10 мл).
- Обеспечивают высокую точность, так как откалиброваны под один конкретный объем.
- Удобны для рутинных операций, где требуется многократное дозирование одного и того же количества жидкости.

#### 2. Пипетки переменного объема

- Позволяют регулировать объем в заданном диапазоне (например, 0,1–5 мл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл и другие).
- Оснащены механизмом настройки (колесико, кнопка или цифровой дисплей в электронных моделях).



На боковой поверхности корпуса всех сертифицированных лабораторных дозаторов обязательно присутствует четкая маркировка, регламентирующая допустимый рабочий диапазон объемов.

**!Важно:** за указанные пределы нельзя выходить. В ином случае дозатор будет непригоден для работы.

В лабораторной практике дозаторы различаются по системе калибровки рабочего объема, что определяет особенности их эксплуатации:

1. Дозаторы с предохранительным механизмом (оснащены специальным фиксатором - предохранительным кольцом)

Для работы с предохранительным механизмом необходимо:

- Поднять предохранитель в активное положение;
- Плавно вращать регулировочное колесо до достижения требуемого объема;
- Вернуть предохранитель в исходное положение для блокировки.

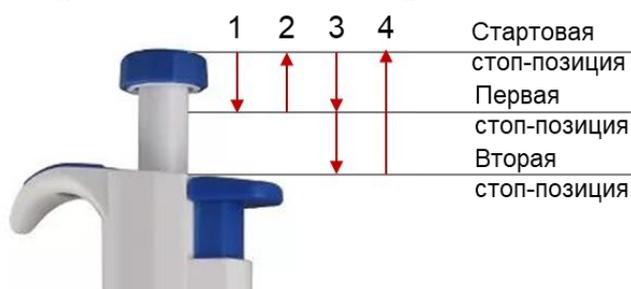
Дозаторы с прямой регулировкой

Для работы с ними необходимо:

- Непосредственно покрутить поршень до нужного объема.

Пипетки-дозаторы могут работать в двух режимах: прямом и обратном дозировании. Разница заключается в способе набора и выдачи жидкости.

## 1. Прямое дозирование (Forward Pipetting)

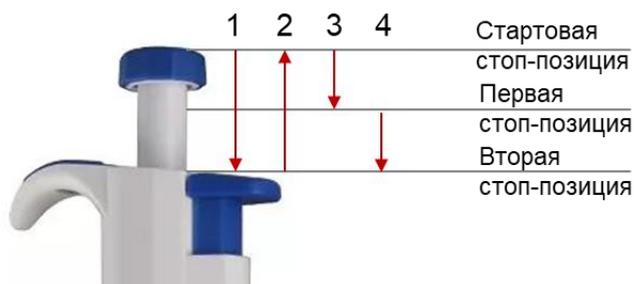


Используется для водных растворов и жидкостей с низкой вязкостью.

### Последовательность действий:

1. Нажмите на кнопку пипетки до первого упора (втягивание воздуха).
2. Погрузите наконечник в жидкость на 3 – 5 мм.
3. Медленно отпустите кнопку – жидкость наберется в наконечник.
4. Перенесите пипетку в приемный сосуд.
5. Нажмите кнопку до первого упора – жидкость выйдет.
6. Для полного опорожнения нажмите до второго упора (остатки выдуваются).
7. Извлеките наконечник из сосуда, отпустив кнопку.

## Обратное дозирование (Reverse Pipetting)



Применяется для вязких, летучих или пенистых жидкостей (например, глицерин, ДМСО).

### Последовательность действий:

1. Нажмите кнопку пипетки до второго упора (полный выпуск воздуха).
2. Погрузите наконечник в жидкость.
3. Медленно отпустите кнопку – жидкость наберется.
4. Перенесите пипетку в приемный сосуд.
5. Нажмите кнопку только до первого упора – основная часть жидкости выйдет.
6. Остаток в наконечнике можно вернуть в исходную пробирку или удалить.

## Выбор метода

Тип жидкости	Рекомендуемый метод
Невязкие растворы - вода, буфер, физиологический раствор и тд.	Прямое дозирование
Вязкие жидкости - глицерин, ДМСО и тд.	Обратное дозирование
Летучие жидкости - спирты, растворители	Обратное дозирование

### Примечание

Для работы с плотными и неоднородными бактериальными суспензиями оптимальным выбором будет обратное дозирование. Но при выполнении серийных разведений предпочтительнее использовать прямое дозирование

#### Важно:

1. Перед любым дозированием суспензию необходимо перемешать.
2. Для каждого разведения следует использовать чистый наконечник.
3. При работе с особо плотными суспензиями можно комбинировать методы.

#### Правила пользования дозатором:

##### 1. Не допускается положение "вверх дном" (наконечником вверх)

- Риск попадания жидкости в корпус прибора
- Нарушение смазки плунжерного механизма
- Повреждение внутренних уплотнителей

##### 2. Правильное размещение на рабочей поверхности

Перед размещением на столе обязательно:

- Снять использованный наконечник
- Установить дозатор в вертикальное положение

! Запрещено оставлять пипет-дозатор:

- С установленным наконечником
- В горизонтальном положении
- Вблизи края рабочей поверхности

##### 3. Ограничения при заборе жидкости. ! Недопустимо:

- Полное погружение корпуса в жидкость
- Касание наконечником дна емкости

##### 4. Соблюдение рабочего диапазона

! Категорически запрещено:

- Превышать максимальный объем.
- Работать ниже минимального объема.

## 2. Построение плана исследований

Планирование исследования представляет собой важнейший этап научной работы, который определяет ее успешность и эффективность. Грамотно составленный план служит надежным ориентиром на всех стадиях исследования, позволяя избежать распространенных ошибок и неоправданных затрат ресурсов.

Основная ценность исследовательского плана заключается в четком определении цели и последовательности действий. Без детального планирования работа часто теряет фокус - исследователь может увлечься второстепенными аспектами и упустить из виду главную научную проблему. Например, изучение влияния химических соединений на организм без конкретизации объекта исследования и параметров оценки даст разрозненные, трудно интерпретируемые данные. С другой стороны, точно сформулированная цель (например, "*Определение пороговой концентрации вещества X, вызывающей изменения показателя Y у объекта Z*") сразу задает направление работы.

Не менее важна ресурсная составляющая планирования. Научные исследования связаны с затратами времени, финансов и материалов.

Детальный план позволяет оптимально использовать реактивы и оборудование, что особенно важно при работе со стерильными материалами, где каждый этап требует строгого соблюдения протоколов. В условиях, когда все компоненты должны сохранять стерильность, ошибки в расчетах или недостаток заранее подготовленных расходников могут полностью остановить ход экспериментов. Кроме того, схема исследований исключает дублирование экспериментов. Повторение одних и тех же опытов без необходимости может исказить результаты из-за накопления систематических ошибок.

### 1. Выбор темы исследования

Тема должна быть актуальной, научно значимой и соответствовать имеющимся ресурсам. Пример: "Исследование штаммов *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* для повышения эффективности молочнокислого брожения в производстве йогурта". Важно провести анализ литературных данных в базах Google Scholar, ResearchGate, PubMed, РИНЦ и т.д., для выявления пробелов в исследованиях.

### 2. Оценка необходимых ресурсов

Необходимо заранее определить потребность в оборудовании (термостаты, автоклав, микроскоп и т.д.), реактивах (питательные среды и их компоненты и т.д.), штаммах бактерий (например, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) и финансировании. Пример: для исследования 5 штаммов потребуется 30 чашек Петри, 10 литров среды, 15 г питательной среды.

### **3. Оценка реализуемости**

Провести пилотные (пробные) эксперименты с 1–2 штаммами для оценки технических сложностей. Пример: тест на рост в разных условиях рН покажет, возможно ли масштабировать исследование. Учесть сроки - оптимизация продолжительности культивирования может занять 2–3 недели.

### **5. Выбор объекта исследований**

Объект должен быть репрезентативным для решаемой проблемы. Пример: для улучшения йогуртовых заквасок выбирают *L. bulgaricus* и *S. thermophilus* из промышленных коллекций, а не почвенные изоляты.

### **6. Формулировка цели и задач**

Цель должна отражать конечный научный или практический результат. Пример: "Разработка комбинированной закваски с ускоренной кислотопродукцией". Задачи: 1) Отбор штаммов по скорости подкисления; 2) Оптимизация соотношения культур; 3) Тестирование в модельной системе.

### **7. Подбор методов и их последовательность**

Методы должны логически вытекать из задач. Пример последовательности: 1) Культивирование на селективных средах (MRS); 2) Измерение кинетики роста (спектрофотометрия); 3) Оценка кислотопродукции (титрование); 4) Пилотное тестирование в молоке. Каждый этап требует контроля стерильности и трехкратной повторности.

### **8. Планирование сроков и этапов**

Реалистично оценить время каждого этапа. Пример: первичный скрининг 5 штаммов займет 3 недели, оптимизация состава закваски - 2 месяца. Важно предусмотреть время на устранение технических проблем.

### **9. Оценка рисков и альтернативные варианты**

Предусмотреть запасные штаммы на случай плохого роста, альтернативные методы анализа. Пример: если спектрофотометр окажется недоступным, использовать серийные разведения и посев на чашки Петри с MRS-агаром для измерения кинетики роста.

### **10. Оформление и корректировка плана**

Документировать все этапы в лабораторном журнале. Пример: фиксировать отклонения рН в каждом эксперименте, чтобы потом проанализировать закономерности. План следует регулярно пересматривать по мере получения данных.

## **2.1 Работа с научной литературой**

### **1. Определение ключевых терминов и стратегии поиска**

Перед началом необходимо выделить основные ключевые слова, связанные с темой исследования. Для работы с молочнокислыми бактериями (LAB) это могут быть:

- "*Lactic acid bacteria fermentation*"

- "*Lactobacillus acidophilus probiotic properties*"
- "*Starter culture optimization dairy*"
- "*Phage resistance in Streptococcus thermophilus*"

Пример: Если тема посвящена повышению устойчивости LAB к бактериофагам в йогуртовых заквасках, ключевыми запросами будут: "*bacteriophage resistance Lactobacillus*", "*CRISPR phage defense dairy cultures*".

## 2. Выбор научных баз данных

Основные источники включают:

- **PubMed** – для биомедицинских исследований (например, влияние LAB на микробиом кишечника).
- **Scopus/Web of Science** – для комплексного анализа публикаций (поиск статей по штаммам *Lactobacillus casei* с антимикробной активностью).
- **Google Scholar** – для широкого охвата, включая патенты (например, новые методы иммобилизации LAB в биореакторах).
- **ScienceDirect/Springer** – для доступа к полнотекстовым статьям по биотехнологии ферментации.

## 3. Использование фильтров и расширенных поисковых операторов

Для сужения результатов применяют:

- **Фильтры по дате** (например, публикации за последние 5 лет по "*Lactobacillus plantarum genome sequencing*").
- **Комбинации слов (AND, OR, NOT):**
  - "*probiotic*" AND "*Lactobacillus*" NOT "*Bifidobacterium*" – чтобы исключить статьи о бифидобактериях.
  - "*yogurt starter culture*" AND ("*phage resistance*" OR "*bacteriophage defense*") – для поиска решений по защите заквасок.

Пример: Поиск "*Lactobacillus fermentum exopolysaccharide production*" *site:.edu* выдаст исследования только с университетских сайтов.

## 4. Анализ обзоров и мета-анализов

Систематические обзоры помогают быстро понять текущее состояние науки. Например:

Обзор *Recent developments of lactic acid bacteria and their metabolites on foodborne pathogens and spoilage bacteria: Facts and gaps* [Food Bioscience, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101741>].

Обзор *Effects of Lacticaseibacillus rhamnosus GG supplementation, via food and non-food matrices, on children's health promotion: A scoping review* [Food Research International, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111518>].

## 5. Ведение библиотеки и цитирование

Собранные статьи систематизируют в менеджерах (Zotero, Mendeley).

Пример структуры:

*Панка "LAB phage resistance": 20 статей + заметки по методам CRISPR.*

*Панка "Dairy fermentation": обзоры по кинетике роста *L. bulgaricus*.*

### 2.2 Работа с научными базами данных

**Google Scholar** (<https://scholar.google.com>) – это бесплатный поисковик научных публикаций: статей, диссертаций, книг и патентов. Он удобен для студентов, исследователей и всех, кто работает с академическими текстами.

У всех научных статей есть DOI. DOI — это цифровой идентификатор объекта (Digital Object Identifier), который присваивается каждой публикации при ее выходе в рецензируемом научном издании.

DOI представляет собой уникальный и неизменный код формата 10.XXXX/XXXXXX, который выполняет несколько функций:

1. Гарантирует подлинность публикации. Наличие DOI подтверждает, что статья прошла научное рецензирование и опубликована в официальном источнике.

2. Обеспечивает постоянный доступ. DOI всегда ведет к актуальному месту хранения публикации, даже если журнал сменит платформу или домен.

3. Стандартизирует цитирование. Все международные стили оформления ссылок (APA, MLA, Chicago, ГОСТ) требуют указания DOI для научных статей.

#### **Как использовать DOI:**

- Для поиска статьи: введите DOI в строку поиска на сайте doi.org или напрямую в Google Scholar

- Для проверки публикации: наличие DOI подтверждает статус официальной научной работы

- Для цитирования: всегда включайте DOI в список литературы

#### **Где найти DOI?**

- На первой странице PDF-версии статьи
- В метаданных публикации на сайте журнала
- В базах данных (Scopus, Web of Science, РИНЦ)



## Perspectives of *Bacillus coagulans* MTCC 5856 in the production of fermented dairy products

Filipp V. Lavrentev , Mariia S. Ashikhmina , Sviatlana A. Ulasevich , Olga V. Morozova ,  
Olga Yu Orlova , Ekaterina V. Skorb , Natalia V. Iakovchenko 

Show more 

+ Add to Mendeley  Share  Cite 

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111623>

Get rights and content 

Full text access 

### 2.3 Оптимизация поиска научной литературы

#### 1. Ввод поискового запроса

После определения ключевых терминов (например, “*Lactobacillus bulgaricus to improve the efficiency of lactic acid fermentation*”) введите запрос в поисковую строку базы данных (Scopus, PubMed, Google Scholar) и нажмите кнопку поиска.

#### 2. Просмотр первых 2-3 страниц результатов

Первые страницы содержат наиболее релевантные работы. Обращайте внимание на:

- **Название статьи**
- **Авторов**
- **Журнал/источник** (приоритет у цитируемых журналов).
- **Год публикации** (для актуальных данных выбирайте статьи не старше 5–7 лет).
- **Количество цитирований** (статья с 200+ цитированиями является ключевой в теме).

#### 3. Для оптимизации поиска литературы используйте сортировку результатов

- **По релевантности** (стандартный вариант, подходит для общего поиска).
- **По дате** (если нужны свежие данные, например, “2023–2024”).
- **По цитируемости** (чтобы найти фундаментальные работы).

#### 4. Модификация запроса (если результатов мало)

- Добавьте уточняющие термины:
  - Вместо “*Lactobacillus fermentation*” попробуйте “*Lactobacillus plantarum lactic acid production optimization*”.

Пример:

Запрос “*milk fermentation Lactobacillus*” слишком широкий – добавьте “*milk fermentation Lactobacillus casei exopolysaccharides*” для конкретики.

#### 5. Работа с найденными статьями

- **Просмотр полного текста:**

- Ищите пометки [PDF] или [HTML] для бесплатного доступа.
- Кликните "**Все версии**" – иногда статья есть в ResearchGate или университетских репозиториях.

- Проверьте DOI (например, *doi.org/10.XXX/X.XX.XXXX.XXXXXX*) для точного поиска.

Пример:

Статья может быть доступна в виде препринта на ResearchGate, даже если в ScienceDirect она платная.

#### 6. Анализ публикации

- **Изучите аннотацию** – если в аннотации упоминается "*high-yield bacteriocin production*", а вам нужны именно антимикробные пептиды, статья релевантна.

- **Просмотрите список литературы** – в статье о *L. helveticus* могут быть ссылки на ключевые работы по геномике LAB.

- **Проверьте "Похожие статьи"** – если основная статья про "*probiotic Lactobacillus in yogurt*", похожие могут касаться "*prebiotic synergy*" или "*gut microbiota modulation*".

## 2.4 Обработка и систематизация литературных данных

Современные научные исследования характеризуются экспоненциальным ростом количества публикуемых работ, что делает ручной анализ литературных данных крайне трудоемким процессом. Традиционные методы обзора литературы становятся недостаточно эффективными для выявления актуальных трендов. Применение методов компьютерного анализа текстов и визуализации данных становится наиболее информативным подходом для выявления взаимосвязей терминов, позволяющих количественно оценить степень внимания научного сообщества к различным аспектам изучаемой проблемы. Такой анализ позволяет выявлять ключевые направления исследований, а также помогает идентифицировать недостаточно изученные области, что важно для планирования новых научных направлений.

Анализ публикаций начинается с поиска релевантных источников. Основные источники:

- Базы данных (Scopus, Web of Science, PubMed);
- Академические поисковые системы (Google Scholar);
- Специализированные журналы.

**Совет:** сохраняйте статьи в структурированном виде (например, в формате .pdf в папке data/).

Для автоматизации и углубленного анализа собранных публикаций можно использовать инструментарий проекта **chemical-assistant/article\_analysis**, который предоставляет инструменты для автоматизированной обработки текстов и визуализации данных.

## Шаг 1. Установка и настройка



```
git clone https://gitlab.com/chemical-assistant/article_analysis.git
cd article_analysis
```

### 1. Установите зависимости:



```
pip install -r requirements.txt
```

### 2. (В списке — pandas, nltk, scikit-learn, matplotlib и др.)

#### Шаг 2. Подготовка данных

- Поместите статьи (PDF или TXT) в папку data/.
- Если у вас уже есть таблица с метаданными (например, экспорт из Scopus), загрузите ее в формате .csv.

#### Шаг 3. Запуск анализа

Основной скрипт (main.py) выполняет:

- **Токенизацию** (разбиение текста на слова).
- **Лемматизацию** (приведение слов к базовой форме, например, "studied" → "study").
- Построение матрицы встречаемости терминов.
- Генерацию тепловой карты (heatmap).

Запуск:

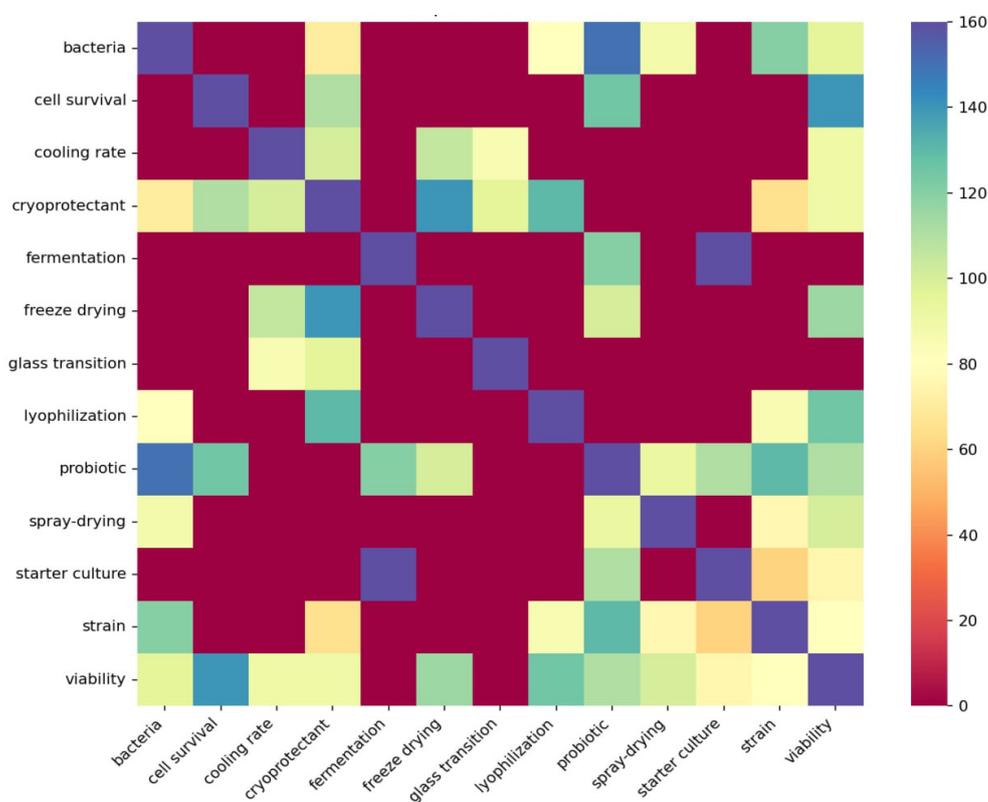


```
python main.py --input_dir data/ --output_dir results/
```

Визуализация данных, т.е. графическое представление информации, позволяет упрощать анализ ключевых тенденций в исследуемой области.

### Пример

Анализ тепловой карты терминов позволяет выявить ключевые направления исследований в области молочнокислых бактерий и методов их консервации.



Наибольшая частота совместного употребления наблюдается для терминов "freeze drying" и "viability" (порядка 160 упоминаний), что свидетельствует о значительном внимании научного сообщества к вопросам сохранения жизнеспособности бактериальных культур при лиофилизации. Также заметную корреляцию демонстрируют понятия "probiotic" и "starter culture" (около 120 сочетаний), отражая активное изучение пробиотических свойств и применения заквасочных культур. В то же время относительно низкая частота термина "spray-drying" (приблизительно 60 упоминаний) указывает на недостаточную изученность методов распылительной сушки по сравнению с другими технологиями консервации. Полученные данные визуализации четко показывают, что основные исследовательские усилия сосредоточены на оптимизации лиофилизации и изучении пробиотических характеристик, тогда как альтернативные методы обработки бактериальных культур требуют дополнительных исследований.

### **3. ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ**

#### **3.1 Проверка стерильности рабочего пространства: смывы на чистоту в ламинарном боксе**

**Смыв на чистоту в ламинарном боксе** – это метод проверки стерильности и отсутствия контаминации внутри ламинарного бокса. Он проводится для контроля уровня чистоты и стерильности в рабочей зоне, чтобы удостовериться в отсутствии микроорганизмов на поверхностях, где выполняются процедуры с биологическими или химическими материалами.

Смывы помогают гарантировать, что рабочее пространство соответствует требованиям безопасности и стерильности для проведения экспериментов или манипуляций с чистыми культурами.

##### **Процедура выполнения смыва на чистоту в ламинарном боксе:**

###### **1. Подготовка к процедуре:**

Перед началом работы вымойте руки и наденьте стерильные перчатки.

Подготовьте стерильные тампоны, пробирки с физиологическим раствором и стерильные чашки Петри с питательной средой.

Убедитесь, что ламинарный бокс был предварительно обработан дезинфицирующими средствами и включен для создания стерильной воздушной среды.

###### **2. Взятие смывов:**

Стерильным тампоном, смоченным в физиологическом растворе, аккуратно протрите поверхности ламинарного бокса, которые могут подвергаться загрязнению (столешница, боковые панели, передняя защитная панель и другие рабочие поверхности).

Особое внимание уделите углам и труднодоступным местам, где могут скапливаться микроорганизмы или пыль.

После каждого смыва поместите тампон в стерильную пробирку с физиологическим раствором для дальнейшего анализа.

###### **3. Посев смывов:**

Перенесите смывы (жидкость из пробирок) на поверхность твердой питательной среды (агара) в чашки Петри с помощью стерильной петли или пипетки.

Равномерно распределите смыв по поверхности среды штриховым методом.

Чашки Петри с посевами поместите в инкубатор при температуре 37°C для выращивания бактерий.

###### **4. Инкубация и наблюдение:**

Инкубируйте чашки Петри в течение 24–48 часов.

По окончании инкубации проверьте чашки на наличие роста колоний микроорганизмов.

## **5. Оценка результатов:**

Если на поверхности агара в чашках Петри обнаружены колонии микроорганизмов, это свидетельствует о наличии контаминации в ламинарном боксе.

Если рост микроорганизмов отсутствует, это означает, что бокс соответствует требованиям стерильности.

При обнаружении контаминации необходимо провести повторную дезинфекцию ламинарного бокса и, при необходимости, усилить меры по поддержанию чистоты.

### **Рекомендации по чистоте в ламинарном боксе:**

Регулярно проводить смывы на чистоту, особенно после интенсивной работы с биологическими материалами.

Следить за тем, чтобы все инструменты и расходные материалы были стерильными до начала работы.

Использовать подходящие дезинфицирующие средства для обработки всех поверхностей.

Соблюдать правила работы в боксе: минимизировать движение рук и инструментов, избегать контакта с поверхностями внутри бокса.

## **3.2 Основы бактериального посева: методы и техника выполнения**

**Бактериальные посе́вы** — это лабораторный метод, используемый для выделения, культивирования и исследования бактерий на питательных средах. Цель бактериального посева — размножить микроорганизмы в условиях, которые позволяют изучить их характеристики, определить их количество или проверить их реакцию на различные факторы, такие как антибиотики или питательные вещества. Этот метод используется во многих областях, таких как медицина, микробиология, пищевая промышленность, фармацевтика и санитарные исследования.

### **Бактериальные посе́вы можно проводить, например, для:**

**Определения чувствительности к антибиотикам:** Посевы используются для тестирования чувствительности бактерий к различным антибиотикам. Бактерии высеиваются на поверхность среды, и на нее помещают диски с антибиотиками. В зависимости от роста или отсутствия роста вокруг дисков можно судить о чувствительности или резистентности бактерий к этим препаратам. Это помогает врачам выбрать наиболее эффективное лечение.

**Изучения бактериальных культур:** Культивирование микроорганизмов на питательной среде позволяет изучить их морфологию (внешний вид колоний), скорость роста, а также их метаболические и биохимические свойства. Это важно для исследования характеристик микроорганизмов в микробиологических и биотехнологических лабораториях.

**Определения количества бактерий в образце:** Бактериальные посевы используются для количественного анализа содержания микроорганизмов в различных образцах. Например, в пищевой промышленности проводится оценка микробного загрязнения продуктов питания или воды. Количественный посев позволяет подсчитать количество жизнеспособных клеток, присутствующих в образце.

**Выделения чистых культур:** Бактериальные посевы помогают изолировать чистую культуру микроорганизмов, то есть один тип бактерий из смешанной популяции. Это важно для дальнейшего изучения конкретных свойств бактерий или их использования в биотехнологиях.

### **Различают несколько типов посевов (рисунок 1):**

**Глубинный посев бактерий (рисунок 1 I)** — это метод, при котором бактериальная культура вносится в разогретую и расплавленную питательную среду, которая затем разливается по стерильным пробиркам или чашкам Петри. После застывания среды бактерии оказываются распределенными по всей толщине среды, а не только на ее поверхности. Этот метод позволяет культивировать как аэробные, так и анаэробные микроорганизмы, что делает его полезным для изучения микробов с различными требованиями к кислороду.

**Поверхностный посев бактерий (рисунок 1 II)** — это метод, при котором микроорганизмы высеиваются на поверхность твердой питательной среды. Этот способ широко используется для выделения, идентификации и количественного анализа бактерий, а также для исследования их метаболической активности и других характеристик.

### **Процедура глубинного посева (рисунок 1 I):**

**Подготовка питательной среды:** Среду, обычно содержащую агар в концентрации 1%, предварительно расплавляют, охлаждают до температуры около 45–50°C (при такой температуре бактерии могут быть введены в среду неповрежденными).

**Внесение бактериальной культуры:** Стерильной пипеткой или петлей бактериальная суспензия по 0,1–1,0 мл выливается на дно чашки Петри. При необходимости можно приготовить несколько разведений для получения изолированных колоний.

**Разлив среды:** Подготовленную и остуженную питательную среду выливают по 15–20 мл в чашки Петри, постоянно совершая круговые движения.

**Инкубация:** Чашки помещают в инкубатор, перевернув дном вверх, где создаются необходимые условия для роста микроорганизмов (температура, влажность и т.д.). В зависимости от типа микроорганизмов инкубация может продолжаться от нескольких часов до нескольких дней.

**Оценка роста бактерий:** После инкубации можно наблюдать, где именно в толще среды появились колонии микроорганизмов. Аэробные бактерии будут расти ближе к поверхности, а анаэробы — в глубине.

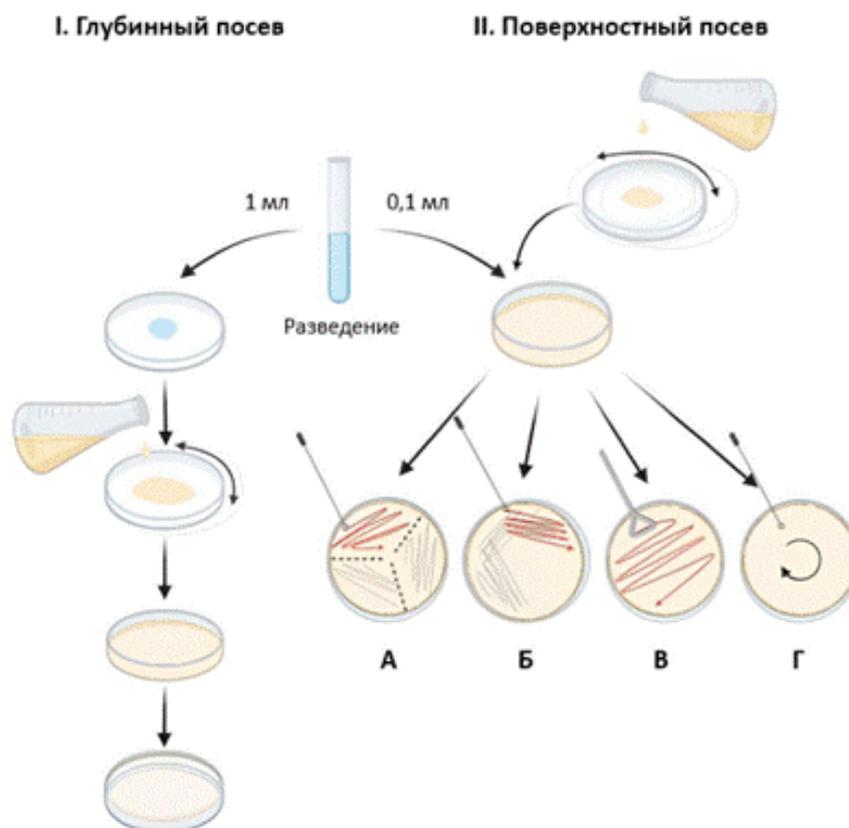


Рисунок 1 – Бактериальные посевы: I – глубинный посев, II – поверхностный посев: А – посев секторами, Б – штриховой посев, В – сплошной посев, Г – круговой посев.

**В особых случаях используют выращивание бактерий в полужидких средах,** содержащие уплотняющее вещество в низкой концентрации. Такие среды применяются для культивирования микроорганизмов в условиях ограниченной подвижности, сохраняя при этом возможность диффузии. В качестве уплотняющего компонента обычно используют агар, снижая его концентрацию до 0,1–0,4 %. Расплавленные среды разливают в стеклянные или пластиковые пробирки со скошенным верхним краем таким образом, чтобы возникающие конвекционные потоки способствовали перемешиванию богатых кислородом верхних слоёв с нижними. Поскольку единственным путём поступления кислорода вглубь среды остаётся диффузия, в толще формируется градиент концентрации кислорода. При посеве культуры колонии, как правило, формируются в нижней части скошенной поверхности — в зоне с минимальной концентрацией кислорода. Анаэробные микроорганизмы растут преимущественно в нижних слоях полужидкой среды.

### **Процедура поверхностного посева:**

**Подготовка питательной среды:** Для поверхностного посева обычно используют агаризованную среду в концентрации 1%, предварительно расплавляя ее.

**Разлив среды:** Подготовленную и остуженную питательную среду выливают по 15–20 мл в чашки Петри, постоянно совершая круговые движения.

**Внесение бактериальной культуры:** По 0,1–1,0 мл выливается в чашку Петри. Стерильной пипеткой или петлей бактериальную суспензию необходимо распределить по поверхности, в зависимости от вида посева. При необходимости можно приготовить несколько разведений для получения изолированных колоний.

**Инкубация:** Чашки или пробирки помещают в инкубатор, где создаются необходимые условия для роста микроорганизмов (температура, влажность и т.д.). В зависимости от типа микроорганизмов инкубация может продолжаться от нескольких часов до нескольких дней.

Существуют **различные виды** поверхностного посева, каждый из которых применяется в зависимости от целей исследования.

#### **1. Посев секторами (рисунок 1 ПА)**

Посев секторами используется для разделения и анализа нескольких бактериальных культур на одной чашке Петри. Чашка делится на несколько секторов, и каждая культура высевается в отдельный сектор.

**Цель:** Исследование нескольких культур одновременно или разделение разных микроорганизмов.

**Техника:** Чашка Петри делится на 3–4 сектора, и в каждый сектор высевается своя культура. Каждый сектор можно обрабатывать разными реагентами или выращивать при различных условиях.

#### **2. Штриховой посев (рисунок 1 ПБ)**

**Цель:** Получение изолированных колоний для чистых культур.

**Техника:** Стерильной петлей захватывают небольшое количество бактериальной культуры и проводят ее по поверхности среды, делая несколько последовательных штрихов. С каждым новым штрихом бактерий становится меньше, что позволяет изолировать отдельные колонии.

#### **3. Сплошной посев (рисунок 1 ПВ)**

Этот метод используется для равномерного нанесения культуры на всю поверхность питательной среды. Сплошной посев позволяет создать плотный слой бактериального роста, который необходим для некоторых тестов.

**Цель:** Тестирование на антибиотикочувствительность и оценка общего количества бактерий в образце.

**Техника:** Стерильной пипеткой или шпателем распределяют бактериальную культуру по всей поверхности чашки Петри, так чтобы она полностью покрыла питательную среду.

#### 4. Круговой посев (рисунок 1 ПГ)

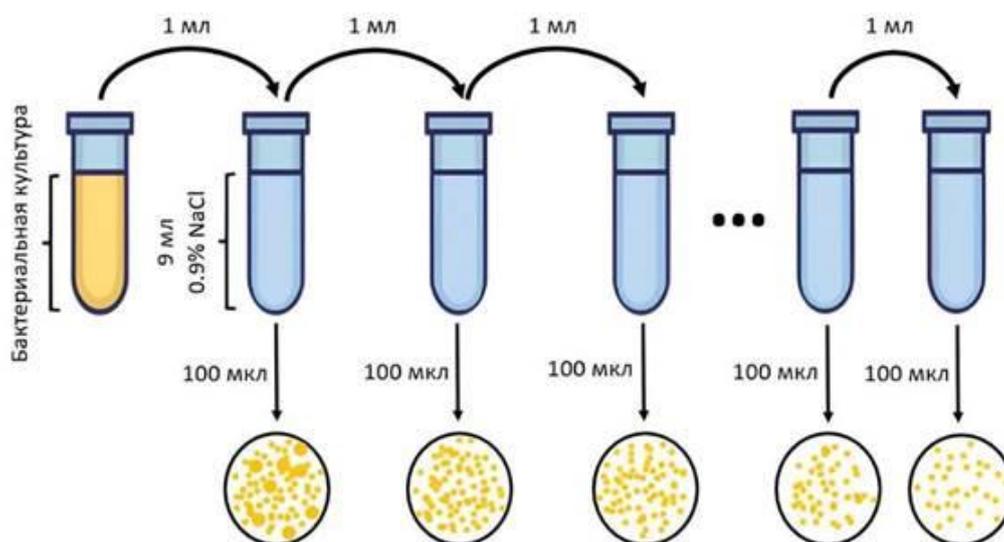
Круговой метод похож на штриховой посев, но культура наносится на поверхность среды круговыми движениями. Этот метод применяется для исследования роста бактерий в равномерно распределенных условиях или для качественного анализа их метаболической активности.

**Цель:** Получение однородных колоний и изучение равномерного роста микроорганизмов.

**Техника:** С помощью петли или шпателя культуру наносят круговыми движениями, начиная с центра чашки и постепенно перемещаясь к краю.

### 3.3 Метод серийных разведений: получение изолированных колоний

Серийное разведение — это метод, используемый для уменьшения концентрации микроорганизмов в образце, что позволяет получить изолированные колонии на питательной среде.



Для получения точных разведений бактериальной суспензии используется метод последовательных (серийных) разведений.

Последовательность действий:

1. Подготовьте среду для разведения (физиологический раствор, буфер или жидкая питательная среда).
2. Хорошо перемешайте исходную бактериальную суспензию (встряхиванием или пипетированием вверх-вниз).
3. Отмерьте 1 мл культуры и перенесите его в первую пробирку, содержащую 9 мл стерильного физиологического раствора. Это соответствует разведению 1:10. Далее следует размешать содержимое

первой пробирки (пипетированием вверх-вниз), затем 1 мл из первой пробирки перенести во вторую пробирку, содержащую 9 мл стерильного физиологического раствора. Это создаст разведение 1:100.

4. Далее повторение этого процесса позволит создать следующие разведения (1:1000, 1:10000 и т.д.), перенося 1 мл из предыдущего разведения в следующую пробирку с 9 мл физиологического раствора

### **3.4 Приготовление и инокуляция ночной культуры бактерий**

Ночная культура (overnight culture) — это бактериальная культура, выращенная в жидкой питательной среде в течение 16–18 часов при оптимальной температуре (обычно 37°C). За это время бактерии достигают стационарной фазы роста, и их концентрация составляет  $\sim 10^9$  КОЕ/мл.

Ход работы:

1. Подготовка среды
  - Приготовьте стерильную питательную среду
  - Объем: 50–100 мл в колбе.
2. Внесение бактерий
  - Стерильным наконечником добавьте 50 мкл-100 мкл биомассы бактерий (из пенициллинового флакона) или 1-2 петли (если бактерии лиофилизированные).
3. Инкубация
  - Уберите колбу в термостат
    - Температура: необходимо посмотреть температуру выращивания штамма по паспорту.
    - Время: 16–18 часов.
4. Проверка результата
  - Успешная культура выглядит мутной

#### **3.4.1 Использование минимальных питательных сред в изучении физиологии микроорганизмов**

Минимальная питательная среда представляет собой важный инструмент в микробиологических исследованиях, выполняя роль "базового конструктора" для изучения физиологии микроорганизмов. По своей сути это искусственно созданная питательная система, содержащая только необходимые компоненты для роста конкретного штамма бактерий, т.е это гибкая система, состав которой можно модифицировать в зависимости от задач исследования и особенностей метаболизма изучаемых микроорганизмов.

**Фундаментальный состав минимальной среды включает:**

1. Источник углерода (глюкоза, лактоза, сахароза, фруктоза и тд.)
2. Источник азота (пептон, триптон, дрожжевый экстракт и тд.)

3. Минеральные соли (чаще всего используется NaCl)  
Количественное соотношение этих компонентов может варьироваться, в зависимости от штамма и целей исследования.

**Ключевые особенности и принципы работы:**

- Состав среды должен адаптироваться под конкретные исследовательские задачи и особенности метаболизма изучаемого микроорганизма.
- Служит основой для изучения:
  - Метаболических путей
  - Регуляции биосинтеза
  - Влияния отдельных факторов на рост

### **3.5 Измерение роста молочнокислых бактерий методом спектрофотометрии**

**Цель работы:** Определить динамику роста молочнокислых бактерий в жидкой питательной среде методом спектрофотометрии.

**Материалы и оборудование:**

- Культуры молочнокислых бактерий:
- Питательная среда: MRS-бульон (или аналогичная среда для молочнокислых бактерий)
- 96-луночный планшет для микропланшетного ридера
- Микропланшетный фотометр (Mindray MR-96A, длина волны 600 нм)
- Стерильные пипетки и наконечники
- Инкубатор (37°C)

**Методика:**

**1. Подготовка среды и инокуляция**

1. Разлейте стерильный MRS-бульон в лунки 96-луночного планшета (по 200 мкл в каждую).
2. В опытные лунки внесите инокулянт бактерий (10 мкл культуры).
3. Контрольные лунки оставьте без инокулянта (только среда).
4. Планшет аккуратно встряхните для равномерного распределения бактерий.

**2. Инкубация и измерение оптической плотности**

1. Поместите планшет в инкубатор при 37°C.
2. Каждые 2–4 часа извлекайте планшет и измеряйте оптическую плотность (OD<sub>600</sub>) на микропланшетном ридере.
3. Перед каждым измерением аккуратно перемешайте содержимое лунок пипетированием (или встряхиванием).
4. Контрольные лунки (без бактерий) используются для калибровки прибора (нулевое значение).

5. Записывайте значения OD600 для каждой временной точки в течение 24–72 часов.

**Ожидаемые результаты:**

1. В первые часы (лаг-фаза) OD600 будет низкой, так как бактерии адаптируются к среде.

2. В экспоненциальной фазе наблюдается резкий рост OD600, что соответствует активному размножению бактерий.

3. В стационарной фазе рост замедляется, и OD600 стабилизируется.

4. В фазе отмирания (если измерение продолжается достаточно долго) OD600 может снижаться из-за гибели клеток.

**Оформление результатов:**

1. Постройте график зависимости OD600 от времени для каждой культуры.

2. Определите продолжительность лаг-фазы, экспоненциальной фазы и стационарной фазы.

3. Сравните динамику роста разных видов бактерий.

**Примечание**

Если спектрофотометр не поддерживает измерение на стандартной длине волны 600 нм, можно использовать ближайшие доступные значения в диапазоне 550–650 нм (например, 580, 630 или 650 нм). Однако при этом следует учитывать:

- Показания OD будут отличаться (обычно снижаются с увеличением длины волны).

- Рекомендуется провести калибровку, сравнив OD на выбранной длине волны с данными при 600 нм или подсчетом клеток.

- Экспоненциальная фаза роста все равно будет хорошо различима, но абсолютные значения оптической плотности могут не совпадать с литературными.

Для точных исследований предпочтительнее использовать 600 нм, но в рамках учебного эксперимента допустима замена на близкие значения.

## Полезные ссылки

**Проект Article Analysis (Chemical Assistant)**

**Видео-инструкции**

**Научно-образовательный центр  
инфохимии Университета ИТМО**

Репозиторий на GitLab:  
[chemical-assistant/article\\_analysis](https://gitlab.com/chemical-assistant/article_analysis)



Ссылка на Google Drive:  
[Открыть папку с видео](#)



Официальный сайт:  
[infochemistry.ru](http://infochemistry.ru)



Группа ВКонтакте:  
[vk.com/infochemistry](https://vk.com/infochemistry)



Ашихмина Мария Сергеевна  
Володарский Михаил Олегович  
Осьмак Ольга Олеговна  
Филозоф Владислав Сергеевич  
Игорь Сергеевич Пантюхин  
Артемий Михайлович Зенкин  
Скорб Екатерина Владимировна

**Практикум по микробиологии и биотехнологии: методы  
работы с микроорганизмами, оборудованием и анализом данных**

**Учебно-методическое пособие**

В авторской редакции

Редакционно-издательский отдел Университета ИТМО

Зав. РИО

Н.Ф. Гусарова

Подписано к печати

Заказ №

Тираж

Отпечатано на ризографе

**Редакционно-издательский отдел**  
**Университета ИТМО**  
197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49, литер А