

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЛИНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

Е. В. АДДЕВА

САНИТАРНАЯ ГИДРОБИОЛОГИЯ

Учебно-методическое пособие по лабораторным работам (лабораторный практикум) для студентов, обучающихся в бакалавриате по направлению подготовки 35.03.08 Водные биоресурсы и аквакультура

Калининград
2023

УДК 574.63(076)

Рецензент

кандидат биологических наук, доцент кафедры водных биоресурсов и
аквакультуры ФГБОУ ВО «КГТУ» О. Е. Гончаренок

Авдеева, Е.В.

Санитарная гидробиология: учеб.-методич. пособие по лабораторным работам для студ. бакалавриата по напр. подгот. 35.03.08 Водные биоресурсы и аквакультура / **Е.В. Авдеева.** – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВО «КГТУ», . – 33 с.

В учебно-методическом пособии по лабораторным работам по дисциплине «Санитарная гидробиология» представлены методические материалы по подготовке к лабораторным занятиям.

Табл. 1, список лит. - 4 наименования

Локальный электронный методический материал. Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ. Рекомендовано к использованию в учебном процессе методической комиссией института рыболовства и аквакультуры ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет» 8 июня 2023 г., протокол № 14

УДК 574.63(076)

© Федеральное государственное
бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Калининградский государственный
технический университет», 2023 г.
© Авдеева Е.В., 2023 г.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Лабораторная работа № 1. Идентификация бактерий по культуральным, морфологическим и физиолого–биохимическим признакам.	5
Лабораторная работ № 2. Санитарно-микробиологическое исследование воды.	12
Лабораторная работа № 3 Определение свойств бактерий.	15
Лабораторная работа № 4.Идентификация бактерий до рода.	18
Лабораторная работа № 5. Санитарно-микробиологическое исследование кормов для рыб.	20
Лабораторная работа № 6 Определение микрофлоры кормов.	22
Приложение 1	24
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	32
СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	33

ВВЕДЕНИЕ

Учебно-методическое пособие разработано для дисциплины «Санитарная гидробиология», входящей в обязательную часть, модуль «Ихтиология и рыбоводство» образовательной программы для бакалавриата по направлению подготовки 35.03.08 Водные биоресурсы и аквакультура.

Целью освоения дисциплины является формирование знаний о процессах, происходящих в системе функционирования различных форм гидробионтов при активном антропогенном воздействии на водную среду, необходимых для ознакомления студентов с санитарными аспектами гидробиологического контроля состояния водоемов; грамотного контроля за состоянием среды при эксплуатации рыбохозяйственных предприятий; грамотной оценки получаемых результатов и другой гидробиологической информации с точки зрения требований рыбного хозяйства; умений и навыков определения санитарно-экологического благополучия естественных и искусственных водоёмов; изучения студентами процессов биологической трансформации основных видов загрязнения в естественных и промышленных условиях.

Задачи изучения дисциплины:

- освоение представлений о качестве воды с санитарно-экологических позиций;
- формирование знаний о влиянии санитарного состояния рыбных кормов с целью обеспечения эпизоотического благополучия объектов аквакультуры;
- приобретение навыков санитарно-микробиологического контроля за водной средой и кормами.

В результате изучения дисциплины студент должен:

знать:

основные виды загрязнителей водоёмов; теорию самоочищения водоёмов; антропогенное воздействие на водные экосистемы;

уметь:

оценивать качество воды по санитарно-микробиологическим показателям; определять качество рыбных кормов для рыбоводных хозяйств различного типа;

владеть:

методами работы по лабораторному исследованию воды и кормов и навыками анализа и составления протоколов исследования.

Лабораторная работа № 1. Идентификация бактерий по культуральным, морфологическим и физиолого-биохимическим признакам

Цели лабораторного занятия: выделение чистых культур бактерий, их идентификация по культуральным, морфологическим и физиолого-биохимическим признакам.

План проведения занятия:

1. Ознакомление с основными принципами выделения бактерий для получения чистой культуры.

2. Изучение выделенных культур бактерий по культуральным, морфологическим и физиолого-биохимическим признакам.

3. Идентификация бактерий до рода и вида.

Оборудование и материалы: термостат, спиртовки, первичные бактериологические посеы на чашках Петри с РПА, бактериологические краски: раствор генцианвиолета, Люголя, фуксина, спирт, штатив для пробирок, предметные стекла, карандаши по стеклу, сухое мыло, марлевые салфетки, вата, лупа, микроскоп, бактериологические петли, пипетки градуированные на 1-10 мл, фильтры бумажные.

Выделение чистых культур бактерий является обязательным условием для их идентификации. Чистой называется культура, состоящая из бактерий одного вида. Такие культуры выделяют из смешанных, состоящих из бактерий двух или нескольких видов, а также непосредственно из патологического материала.

Чистые культуры из смешанных выделяют механическим и биологическим способами. Механический способ основан на изоляции одной бактериальной клетки. На практике изоляция бактериальной клетки осуществляется путем разведения их при посеве на плотные питательные среды истощающим мазком с помощью шпателя Дригальского или путем дробного разведения (1:100, 1:1000 и т. д.) смешанной культуры на физиологическом растворе с последующим посевом суспензии бактерий различных концентраций. С увеличением кратности разведения количество микробных единиц в суспензии пропорционально уменьшается, и при посеве больших разведений на плотной питательной среде вырастают изолированные колонии бактерий. Биологический способ выделения чистых культур основан на создании условий селективности и использовании физиологических свойств микробов – чувствительности их к различным температурам, рН, концентрациям солей, антибиотикам и др. При селективном выделении развитие одних бактерий подавляется, другие растут беспрепятственно, в результате на питательной среде развиваются однотипные бактерии. Колонии бактерий в первые сутки морфологически мало отличаются одна от другой, поэтому чистую культуру бактериальной флоры рыб рекомендуется выделять через 2–3 суток, когда колонии достигнут определенной конфигурации и структуры. Так как клетки различных видов бактерий могут располагаться на агаре близко одна от другой и при развитии сливаться в одну колонию, то очистку культуры следует повторять выше описанными методами 2–3 раза. Однородность и чистоту бактериальных культур проверяют

макроскопически, исследуя структуру колоний на агаре через лупу, и микроскопически – исследуя мазки суточных культур, окрашенные по методу Грама. Проверенные на чистоту штаммы бактериальных культур пересевают на скошенный агар для получения рабочей культуры и на полужидкий агар в целях сохранения дубликатной культуры. Культуры выдерживают в термостате до появления обильного роста и затем ставят в холодильник при температуре 37 °С. Рабочую культуру при необходимости пересевают каждые 2–3 суток, дубликатную культуру – 1 раз в месяц. В дальнейшем проводят идентификацию чистых культур бактерий.

Идентификация – это комплекс исследований, направленных на определение таксономической принадлежности бактерий. Идентификацию осуществляют изучением культуральных, морфологических, физиологических, биохимических, антигенных и других признаков бактерий.

Культуральные признаки – это характер роста бактерий на различных питательных средах общего назначения. Учитывают их через сутки после посева и далее в течение недели. При культивировании бактерий на жидких средах (МПБ, РПБ) отмечают степень помутнения среды, наличие и характер поверхностной пленки и осадка (пленка тонкая, толстая, слизистая, морщинистая, окрашенная, кольцо на стенке пробирки; осадок точечный, зернистый, хлопьевидный, слизистый, дымчатый, беловато-желтый). При культивировании бактерий на плотных средах (МПА, РПА) учитывают: степень развития и характер роста (отсутствие, скудный, умеренный, хороший, отдельными колониями, сливной, нитевидный, распространяющийся, корневидный); форму колоний (круглая, овальная, звездчатая, корневидная, волокнистая, хлопьевидная); размер колоний (росинчатые, точечные – диаметр меньше 1 мм, мелкие – 1–2 мм, средние – 2–4 мм, крупные – более 4 мм); край колоний (ровный, волнистый, изрезанный, зубчатый, бахромчатый, локонообразный, бухтообразный, лопастной, изъеденный, ворсинчатый, ползучий); поверхность колоний (гладкая, шероховатая, складчатая, волнистая, блестящая, матовая, узорчатая, зернистая, изрытая, сухая, влажная); различные типы колоний бактерий на твердой питательной среде: круглая; круглая с фестончатым краем; круглая с валиком по краю; ризоидные; круглая с ризоидным краем; амебовидная; нитевидная; складчатая; неправильная; концентрическая; сложная; рельеф колоний (плоский, приподнятый, выпуклый, вогнутый, вдавленный); консистенцию колоний (слизистая, вязкая, крошковатая); прозрачность колоний (прозрачная, полупрозрачная, опалесцирующая или мутная, темная); внутреннюю структуру колоний (однородная, зернистая, радиально или концентрически исчерченная); пигментообразование (окраска среды вокруг колонии или самой колонии); цвет колоний (бесцветные, синеватые, серые, белые, желтые, оранжевые или другие).

При культивировании бактерий на средах с желатином (МПЖ, РПЖ), помимо характера роста, определяют наличие протеолитических ферментов бактерий. Учитывают следующие признаки: рост по уколу (в виде ленты, нити, гвоздя со шляпкой, равномерный, прерывистый, поверхностный); разжижение желатина (чашечкой, воронкой, гвоздем, цилиндром, кратером, чулком,

послойное, пузырчатое в глубине, поверхностное); скорость разжижения (быстро, медленно); изменение окраски среды (зеленая, синяя и др.).

Тест на протеолитическое разжижение желатина проводят следующим образом. Посев суточной культуры бактерий производят уколом в столбик среды с рыбо-пептонным желатином, погружая петлю до дна пробирки. Бактерий, способных расти при низкой температуре, оставляют стоять в комнате при 20–22 °С. Остальные посевы инкубируют в термостате при 36 °С. При температуре 36 °С желатин плавится, поэтому после инкубации пробирки опускают в холодную воду или ставят в холодильник. Если под действием фермента желатиназы произошло расщепление белков желатина, отмечается разжижение питательной среды. Затвердение желатина в пробирке свидетельствует об отсутствии у бактерий протеолитического фермента.

При изучении морфологических признаков описывают форму бактериальной клетки и ее структуры. Морфологические признаки бактерий претерпевают изменения с возрастом культуры, поэтому их изучают у суточных культур. К основным морфологическим признакам относят: величину клетки бактерий; форму бактериальной клетки; наличие спор; наличие капсулы; отношение бактерий к окраске по Граму.

Выявляют морфологические признаки микроскопией живых бактерий (методы висячей и раздавленной капли) и окрашенных препаратов. Традиционным методом окраски бактериальных клеток является метод окраски по Граму. Методика окраски бактериальных культур по Граму. На обезжиренное предметное стекло наносят каплю воды и вносят в нее бактериальную культуру. Растирают культуру в капле воды на площади примерно 4 см². Мазок высушивают на воздухе до полного удаления влаги. Затем мазок фиксируют. Для этого предметное стекло с расположенным сверху мазком проводят трижды через пламя горелки или спиртовки. На остывший мазок накладывают кусочек фильтровальной бумаги и наливают раствор генцианвиолета на 2 мин. Затем бумагу убирают и обрабатывают мазок раствором Люголя в течение 1–2 мин до его почернения. Далее наносят на мазок несколько капель 96%-ного спирта и выдерживают 30 сек. Промывают водой и докрашивают фуксином Циля в течение 2 мин. Промывают водой до чистой капли. На высушенные окрашенные препараты наносят каплю иммерсионного масла, просматривают под микроскопом (при увеличении объектива микроскопа ×90 или ×100).

Физиологические признаки.

В процессе физиологической жизнедеятельности микроорганизмов осуществляется непрерывный обмен веществ микробной клетки с естественной или искусственной средой обитания (окружающая среда, организм человека и животных, питательные среды). Основные физиологические функции клетки заключаются в питании, дыхании, росте и размножении. Определяющее значение при выборе питательных сред для выделения и идентификации имеют особенности питания и дыхания микроорганизмов. Микроорганизмы характеризуются разной способностью использовать органические и неорганические источники питания и энергии. Чем больше готовых соединений

получает микроорганизм, тем ниже его способность к биосинтезу основных клеточных макромолекул.

По способности усваивать углерод бактерии подразделяют на две группы: автотрофов (аутотрофов) (от греч. *autos* – сам, *trophe* – питание) – усваивают углерод из CO₂ (например, почвенные нитрифицирующие бактерии) и гетеротрофов (от греч. *heteros* – другой) – усваивают углерод из готовых органических соединений. Гетеротрофные микроорганизмы разделяют на сапрофитов (от греч. *sapros* – гнилой, *phyton* – растение) и паразитов (от греч. *parasitos* – нахлебник). К сапрофитам относится наибольшая часть существующих бактерий. Паразиты (около 0,1 % видов бактерий) существуют за счет органических веществ живых клеток. Различают облигатных и факультативных паразитов. Однако не всегда между ними, а также сапрофитами, можно сделать четкое разделение, так как в зависимости от условий обитания патогенные бактерии могут существовать в окружающей среде как сапрофиты и вызывать заболевания у человека и животных.

Совокупность биохимических процессов, при которых высвобождается энергия, обеспечивается жизнедеятельность бактерий, называется дыханием. По типу дыхания микроорганизмы подразделяют на несколько групп:

- облигатные (строгие) анаэробы. Рост и развитие в среде происходят при отсутствии свободного кислорода. К облигатным анаэробам относятся, например, споровые клостридии;

- облигатные (строгие) аэробы. Рост и развитие происходят в атмосфере кислорода (около 20 %). К облигатным аэробам относятся бактерии родов *Pseudomonas*, *Alcaligenes* и др. Они растут на поверхности жидких и плотных питательных сред;

- микроаэрофилы. Бактерии требуют для своей жизнедеятельности существенно меньшего количества кислорода. Некоторые из них («капнофильные микроорганизмы» от греч. *karnos* – дым, *philos* – любящий) хорошо растут при повышенном содержании CO₂. К микроаэрофилам относятся, например, актиномицеты, молочнокислые бактерии;

- факультативные анаэробы. Размножение может происходить как при наличии, так и в отсутствие молекулярного кислорода. К факультативным анаэробам относится большинство патогенных, условно-патогенных и сапрофитных бактерий (энтеробактерии, стрептококки и др.).

Для определения отношения бактерий к кислороду проводят высев в столбик полужидкой среды (ПЖА, среды Гисса с углеводами и др.). Аэробы растут поверхностной пленкой, факультативные анаэробы – равномерно по всему уколу, облигатные анаэробы – в глубине среды, у дна пробирки, аэротолерантные бактерии рассеиваются по всему столбику среды, микроаэрофильные – в верхней трети среды.

На полужидких средах выявляют, кроме того, подвижность бактерий. Подвижные бактерии вырастают на всей поверхности среды или вызывают ее диффузное помутнение, неподвижные – растут строго по уколу.

Бактерии значительно различаются между собой по отношению к абиотическим факторам внешней среды. Для целей идентификации или

прогнозирования вспышки того или иного инфекционного заболевания определяют, прежде всего, отношение микроорганизмов к температуре. С этой целью посева на подходящих жидких или плотных питательных средах выдерживают при различных температурах.

Биохимические признаки характеризуются особенностями обмена веществ бактерий. Они обусловлены наличием в клетках набора ферментов, с помощью которых происходит расщепление или синтез различных химических веществ. Биохимические признаки определяют при выращивании бактерий на дифференциально-диагностических средах. Наличие некоторых ферментов бактерий, а также ряда продуктов обмена выявляют, кроме того, с помощью различных реактивов и индикаторных бумажек. Для определения биохимических признаков следует использовать только суточные культуры бактерий.

При первичной ориентировочной идентификации выделенных изолятов бактерий используют оксидазный тест. Отбор колоний бактерий для выявления фермента цитохромоксидазы можно осуществить в первичных посевах патологического материала с помощью реактива, состоящего из равных частей 1%-ного спиртового раствора α -нафтола и 1%-го водного раствора диметилпарафенилендиамина. Для этого часть колонии бактерий снимают бактериологической петлей, переносят на кусочек фильтровальной бумаги и слегка растирают в капле смешанного реактива. Реакцию учитывают в течение трех минут. При наличии оксидазы колония окрашивается в синий цвет, при ее отсутствии – цвет колонии не меняется.

Для целей идентификации грамположительных бактерий проводят тест на наличие каталазы. Это фермент, катализирующий разложение перекиси водорода на воду и газообразный кислород: $2\text{H}_2\text{O}_2 = 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2\uparrow$. Для выявления каталазы на предметное стекло наносят каплю 3,5%-ной перекиси водорода. Вносят в нее бактериологическую петлю с подозрительной колонией и выдерживают несколько секунд. При наличии каталазы вследствие выделения газообразного кислорода колония бактерий начинает «пениться» (выделяются пузырьки газа), при отсутствии каталазы – выделение пузырьков газа отсутствует.

Дальнейшая идентификация выделенной культуры бактерий подразумевает проведение теста окисления-ферментации и определения способности бактерий разлагать углеводы. Тест окисления-ферментации (OF-тест). Исследуемую культуру высевают уколом в две пробирки со средой Хью-Лейфсона. В одну из пробирок после внесения культуры бактерий наливают стерильное вазелиновое масло слоем не менее 0,5 см. Обе пробирки инкубируют в термостате при температуре, оптимальной для данной бактериальной культуры (как правило, 22–28 °С). В зависимости от включенного в состав среды углевода (обычно глюкозы) определяют способность бактерий осуществлять его разложение. По пробирке без масла определяют окисление (способность бактерий разлагать углеводы в аэробных условиях), по пробирке с маслом – ферментацию (способность бактерий разлагать углеводы в анаэробных условиях). Об окислении или ферментации свидетельствует изменение цвета

среды в соответствующей пробирке с травянисто-зеленого на желтый. Возможны четыре варианта разложения бактериями углеводов (на примере глюкозы) на среде Хью-Лейфсона. Характер разложения бактериями различных углеводов определяют на полужидких средах Гисса, в состав которых входит какой-либо углевод (глюкоза, лактоза, сахароза, мальтоза, маннита, арабиноза, рамноза и др.) и индикатор. В качестве индикаторов могут быть использованы индикатор бромтимоловый синий, индикатор Андрее, индикатор ВР. На среде Гисса учитывают способность бактерий разлагать углеводы до смеси кислот (молочной, уксусной, углекислоты и др.) и газа (H_2 , CO_2). Образование кислоты определяют по изменению цвета среды, образование газа – по ее разрыву, вспениванию или растрескиванию.

Посев в среду производят уколом, термостатируют в течение суток. Ход дальнейшего процесса идентификации бактерий определяется отдельно для каждой таксономической группы.

Для видовой идентификации штамма бактерий определенного рода необходим набор различных питательных сред и реактивов. Способность бактерий ферментировать некоторые углеводы (глюкозу, лактозу, сахарозу), образовывать газ и сероводород определяют на дифференцирующих средах, содержащих сахара и соль железа. Это агар Клиглера, железо-глюкозо-лактозный агар с мочевиной, трехсахарный агар с солями железа, среда Олькеницкого. Решающее значение данные питательные среды имеют при идентификации бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Готовые среды должны иметь скошенную часть и столбик. Исследуемые культуры высевают на скошенную среду штрихом, а в столбик – уколом. Термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение суток, после чего приступают к учету результатов. Характер ферментативных процессов определяется составом используемой среды.

Агар Клиглера. Среда предназначена для дифференциации бактерий по способности их ферментировать глюкозу, лактозу и образовывать сероводород.

Принцип действия. При расщеплении сахаров образуется кислота, что улавливается с помощью индикатора (фенолового красного, окрашивающего среду в желтый цвет). В первые часы роста (в аэробных условиях) бактерии, ферментирующие только лактозу, утилизируют ее полностью в скошенной части агара. К моменту учета реакции (18–24 ч) они используют в качестве питательного субстрата пептоны, содержащиеся в питательной среде. При этом в скошенной части среды образуется аммиак и происходит подщелачивание среды – скошенная часть среды приобретает красный цвет. В столбике желтый цвет сохраняется, хотя глюкоза за этот срок ферментирована, кислые продукты ее расщепления в анаэробных условиях еще сохраняются и поддерживают низкое значение рН. Получаются желтый столбик и красный скос среды. Учет результатов на агаре Клиглера производят каждые сутки, но не позднее 48 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С по способности бактерий ферментировать лактозу (пожелтение скошенной части среды), глюкозу (пожелтение столбика), образовывать газ (наличие пузырьков или разрыва среды в столбике) и продуцировать сероводород (почернение среды в столбике). При слабом

образовании сероводорода наблюдается почернение на границе столбика и скошенной части среды или реже – на дне пробирки. В случае отрицательной реакции среда остается красной, либо скошенная поверхность приобретает малиновый оттенок.

Среда Олькеницкого (трехсахарный агар с мочевиной). Среда предназначена для дифференциации бактерий по способности ферментировать сахара: глюкозу, лактозу и сахарозу, так же, как в среде Клиглера. Присутствие в среде мочевины позволяет определить наличие у бактерий фермента уреазы. Принцип работы среды Олькеницкого такой же, как агара Клиглера в отношении углеводов и выявления сероводорода. Расщепление мочевины завершается выделением аммиака ($pH = 8,1$), под воздействием которого скошенная часть и столбик среды приобретают красную окраску. Поэтому для уреазоположительных штаммов бактерий учет ферментации углеводов на этой среде невозможен. Бактерии, сбраживающие глюкозу и лактозу, вызывают подкисление во всей среде: желтого цвета столбик и скошенная часть. Лактоза, концентрация которой в среде в 10 раз выше, чем глюкозы (1 %), через 18–24 ч еще не исчерпана и в скошенной части, и в столбике среды. Вследствие этого вся среда окрашивается в желтый цвет. После 48 ч инкубации посева в среде также будет наблюдаться щелочение скошенной части агара за счет расщепления пептонов и покраснение скошенной части. Если бактерии при ферментации углеводов в качестве конечного продукта метаболизма образуют газ (H_2 и CO_2), появляются разрывы среды и скопление газа на дне пробирки, вследствие чего столбик агара приподнимается. Некоторые бактерии продуцируют тиосульфат-редуктазу, вследствие чего способны образовывать сероводород из неорганических соединений серы. При образовании сероводорода в среде появляется черное окрашивание.

Образование сероводорода и аммиака можно определить также другим способом. Для этого под ватно-марлевые пробки пробирок с посевами суточной культуры бактерий на мясо- или рыбо-пептонном бульоне (МПБ или РПБ) подвешивают индикаторные бумажки. Для индикации сероводорода используют полоску фильтровальной бумажки, смоченной 10%-м раствором уксуснокислого свинца, аммиака – смоченную водой лакмусовую бумажку. При образовании сероводорода бумага чернеет, аммиака – синеет.

Образование индола. Под ватно-марлевую пробку пробирки с МПБ (РПБ), засеянной исследуемой культурой бактерий, подвешивают полоску фильтровальной бумажки, смоченной 12%-ным водным раствором щавелевой кислоты. При образовании индола бумажка розовеет.

Образование ацетилметилкарбинола (тест Фогеса–Проскауэра или тест VP) и реакция на метилрот (тест MR). Культуру бактерий на среде Кларка через 3–5 суток инкубирования разливают поровну в две пробирки. В одну пробирку добавляют 0,5 мл 6%-го спиртового раствора α -нафтола и 1 мл 16%-го раствора едкого калия. Пробирку встряхивают и ставят в штатив. При образовании ацетилметилкарбинола через 3–5 мин появляется вишневое окрашивание всей среды или ее поверхностного слоя. В другую пробирку добавляют несколько капель 0,04%-го спиртового раствора метилового красного. При положительной

реакции появляется красное окрашивание среды, при отрицательной реакции – среда становится желтого цвета.

Редукция нитратов в нитриты. К культуре бактерий на МПБ (РПБ) с калийной селитрой (KNO_3) через 3–4 дня инкубации приливают 0,5 мл 10%-го раствора серной или 20%-го раствора уксусной кислоты и 0,5 мл раствора крахмала с йодистым калием. Появление коричневой или черной окраски смеси показывает на переход нитратной соли в нитритную. Состав раствора: крахмала – 1 г, йодистого калия – 0,5 г, дистиллированной воды – 10 мл.

Декарбоксилирование аминокислот. Суточную культуру бактерий засевают в пробирку с питательной средой, содержащей аминокислоту (лизин, аргинин, орнитин). После высева бактерий пробирки со средой заливают слоем вазелинового масла толщиной 0,5 см. Параллельно ставят контрольную незасеянную пробирку со средой, залитую вазелиновым маслом. Посевы термостатируют в течение 3–5 суток. Бактерии, обладающие декарбоксилазной (по лизину и орнитину) или дегидролазной (по аргинину) активностью, изменяют цвет среды от оранжевого до сиреневого (щелочная, положительная реакция). При отрицательной (кислой) реакции среда желтеет.

Гидролиз эскулина (дифференциальный тест на бактерии рода *Enterococcus*). На полужидких средах с эскулином определяют способность бактерий гидролизовать эскулин с образованием эскулетина и глюкозы. Тест является определяющим при идентификации стрептококков группы D, аэромонад и некоторых других бактерий. Посев в среду производят уколом. Гидролиз эскулина определяют по почернению среды за счет распада эскулина в присутствии ионов железа. С этой же целью используют плотную среду – агар с желчью и эскулином (bile esculin agar). На данной среде хорошо растут стрептококки группы D, поскольку, в отличие от грамположительных бактерий, желчь не подавляет их рост. Гидролиз эскулина проявляется как покоричневение среды вокруг темно-коричневых или черных колоний. Толерантность к желчи и способность гидролизовать эскулин составляет тест для предварительной идентификации стрептококков группы D.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ РАБОТЫ.

ЗАПРЕЩАЕТСЯ прикасаться руками к исследуемому материалу и культурам микробов. Все необходимые операции с названными объектами проводятся только с использованием специальных инструментов.

ЗАПРЕЩАЕТСЯ переливать жидкости, содержащие живые клетки микроорганизмов, из одного сосуда в другой; оставлять на столах нефиксированные мазки, открытую посуду с посевами.

Лабораторная работа № 2. Санитарно-микробиологическое исследование воды

Цели лабораторного занятия: определение степени загрязненности воды.

План проведения занятия:

1. Посев воды

2. Определение обсемененности воды сапрофитными бактериями.

3. Определение обсеменности воды бактериями группы кишечной палочки.

4. Пересев культур на скошенный агар.

Оборудование и материалы: вода, спиртовки, скошенный агар, бактериологические петли, пинцеты, питательные среды. бактериологические краски: раствор генцианвиолета, Люголя, фуксина, спирт, штатив для пробирок, предметные стекла, карандаши по стеклу, сухое мыло, марлевые салфетки, вата, лупа, микроскоп, бактериологические петли, пипетки градуированные на 1–10 мл, фильтры бумажные, термостаты.

Пробы воды отбирают в стерильные стеклянные бутылки. Их снабжают сопроводительным документом. В нем указывают наименование водоема, его местонахождение, метеорологические условия (температура воды, наличие осадков, ветра, волнения), дата взятия пробы (час, число, месяц).

Исследование производят не позднее 2-х часов с момента отбора проб. Посевы проб воды осуществляют в лаборатории бактериологии КГТУ.

Санитарно-бактериологическое исследование проб воды поверхностных водоемов проводят следующим образом: к 10 мл исследуемой воды добавляли в 90 мл РПБ. Последующие разведения готовят по следующей схеме: к 9 мл бульона добавляли по 1 мл соответствующего разведения. Затем осуществляли посев на среду Эндо, среду Рябова, РПБ, на ЛББ и Псевдосель-агар (см табл. 1).

Агар Эндо предназначен для выделения бактерий группы кишечной палочки, разлагающих или не разлагающих лактозу, входящую в состав среды. Также на этой среде выделяют другие группы грамотрицательных бактерий.

Среду Эндо готовили следующим образом: 100 мл рыбо-пептонного агара (РПА растапливали и охлаждали до температуры 70 °С. Прибавляли 1 г лактозы, предварительно растворенной в стерильной пробирке в небольшом количестве дистиллированной воды и прокипяченной).

В отдельных пробирках приготавливали 2-3 мл спиртового насыщенного фуксина и 10 мл 10% водного раствора сульфида натрия.

В стерильную пробирку отмеривали 1 мл фуксина и прибавляли раствор сульфида натрия до обесцвечивания фуксина (бледно-розовый цвет). Приготовленную смесь вливали в растопленный агар, хорошо перемешивали и разливали по чашкам. Горячий агар имел бледно-розовый цвет, а при застывании становился бесцветным. Среду готовили в день использования. рН среды 7,4.

Среду Рябова готовили из РПА заводского производства. К 1000 мл РПА добавляли лимонно-аммиачное железо - 1 г, гипосульфита - 0,15 г. Затем всю смесь кипятили и стерилизовали 20 мин при температуре 121 С. Среда предназначена для количественного учета сапрофитных бактерий, разлагающих белки с выделением сероводорода.

Лактозный бульон с борной кислотой готовили следующим образом: на 1000 мл воды брали: пептона- 10 г, двуосновного фосфата калия (безводный, фосфорно-кислый, двузамещенный): K_2HPO_4 - 12,2 г, основного фосфата калия (безводный, фосфорно-кислый, однозамещенный): $KHPO_4$ - 4,1 г, борной

кислоты – 3,2—3,5 г, лактозы – 5,0 г, затем растворяли и разливали по 5,0 мл с поплавками в пробирке. Стерилизовали при 0,5 атм. при 112 °С 12 мин. Срок хранения среды - 2 недели. Среду применяли для обнаружения *E.coli*; инкубировали при 43 °С.

Псевдосель-агар использовали для изоляции и идентификации *Pseudomonas aeruginosa*. В состав агара входят панкреатический гидролизат желатина, хлорид магния, сульфат калия, агар, цетримид. Для приготовления среды использовали псевдосель-агар промышленного производства: к 1000 мл дистиллированной воды добавляли 45,3 г агара. Смесь кипятитли, стерилизовали при 118°С 15 мин.

Таблица 1 - Санитарно-бактериологическое исследование проб воды поверхностных водоемов методом приготовления 10-кратных разведений

Приготовление 10-кратных разведений РПБ	1,0 мл 10 ⁻¹	1,0 мл 10 ⁻²	1,0 мл 10 ⁻³	1,0 мл 10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	Температура инкубирования, °С
вода	90	9,0	9,0	9,0	9,0 —>	37
	10	↓	↓	Высев ↓	↓	↓
РПБ (4,5)	U	U	U	U	U	
	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	37
Среда Рябова	↓	↓	↓	↓	—>	
	O	O	O	O	—	
Среда Эндо	0,5	0,5	0,5	0,5	————— →	22
	↓	↓	↓	↓		
ЛББ	O	O	O	O	—	
	0,1	0,1	0,1	0,1	————— →	37
Псевдосель-агар	↓	↓	↓	↓		
	U	U	U	U		
Псевдосель-агар	0,5	0,5	0,5	----- -----	————— —>	42
	↓	↓	↓	↓		
Псевдосель-агар	O	O	O	O	-----	
	0,1	0,1	----- -----	----- -----	----- ----- →	37
	↓	↓				

Затем изучали культуральные, морфологические и биохимические признаки бактерий.

Культуральные признаки – это характер роста бактерий на различных средах общего назначения. Учитывали их через сутки после посева и далее в течение недели. На твердых питательных средах отмечали следующие признаки: степень развития и характер роста (отсутствие, скудный, умеренный, хороший, отдельными колониями, сливной, нитевидный, распространяющийся, корневидный); размер колонии (круглая, овальная, звездчатая, корневидная, волокнистая, хлопьевидная); размер колоний (росинчатые, точечные – диаметр меньше 1мм, мелкие – 1-2мм, средние – 2-4мм, крупные – более 4мм); край колонии (ровный, волнистый, изрезанный, зубчатый, бахромчатый, локонообразный, бухтообразный, лопастной, изъеденный, ворсинчатый, ползучий); поверхность колонии (гладкая, шероховатая, складчатая, волнистая, блестящая, матовая, узорчатая, зернистая, изрытая, сухая, влажная); рельеф колоний (плоский, приподнятый, выпуклый, вогнутый, вдавленный); консистенцию колоний (слизистая, вязкая, крошковидная); прозрачность колоний (прозрачная, полупрозрачная, опалесцирующая или мутная, темная); внутреннюю структуру колоний (однородная, зернистая, радиально или концентрически исчерченная); пигментообразование (окраска среды, цвет колоний – бесцветные, синеватые, серые, белые, желтые, оранжевые). Эти признаки являются существенными при определении вида бактерии. Однако надо учитывать, что у одного и того же вида бактерий колонии могут быть неодинаковыми в различные периоды роста и при выращивании их в разных условиях и даже при различной густоте.

На жидкой питательной среде (рыбо-пептонном бульоне) учитывали характер и наличие пленки, степень помутнения среды, наличие осадка.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ РАБОТЫ.

ЗАПРЕЩАЕТСЯ прикасаться руками к исследуемому материалу и культурам микробов. Все необходимые операции с названными объектами проводятся только с использованием специальных инструментов.

ЗАПРЕЩАЕТСЯ переливать жидкости, содержащие живые клетки микроорганизмов, из одного сосуда в другой; оставлять на столах нефиксированные мазки, открытую посуду с посевами.

Лабораторная работа № 3 Определение свойств бактерий.

Цели лабораторного занятия: изучение морфологических признаков бактерий выделенных из воды и посев культур на дифференциально–диагностический ряд.

План проведения занятия

1. Приготовление мазков.
2. Окраска мазков по Граму.
3. Посев выделенных культур на короткий дифференциально–диагностический ряд.

Оборудование и материалы: вода, спиртовки, скошенный агар, бактериологические петли, пинцеты, питательные среды. Бактериологические

краски: раствор генцианвиолета, Люголя, фуксина, спирт, штатив для пробирок, предметные стекла, карандаши по стеклу, сухое мыло, марлевые салфетки, вата, лупа, микроскоп, бактериологические петли, пипетки градуированные на 1–10 мл, фильтры бумажные, термостаты.

Основные морфологические признаки бактерий – величина, форма, спорообразование, капсулообразование, отношение бактерий к окраске по Граму. Морфологические признаки претерпевают изменения с возрастом культуры, поэтому их принято изучать у суточных культур бактерий при микроскопировании мазка, окрашенного по Граму.

Для получения суточных культур часть колонии с РПА стерильной бактериологической петлей переносили на поверхность скошенного агара зигзагообразно. Пробирки с посевами выдерживали в термостате в течение суток при температуре 37 °С.

Окраску по Граму проводили следующим способом: на обезжиренное предметное стекло наносили каплю воды и растирали в ней бактериальную культуру. Мазок высушивали и фиксировали в пламени горелки. На остывшее стекло накладывали кусочек фильтровальной бумаги и наливали раствор генцианвиолета на 2 мин. Убирали бумагу и наливали раствор Люголя на 2 мин, затем мазок обрабатывали спиртом и промывали водой. Докрашивали фуксином в течение 2 мин и промывали водой. Высушенные мазки смотрели под микроскопом на большом увеличении с иммерсией и определяли морфологические признаки бактерий.

Биохимические признаки характеризуются особенностями обмена веществ бактерий. Они обусловлены наличием в клетках набора ферментов, с помощью которых происходит расщепление или синтез различных химических веществ. Биохимические признаки бактерий изучали постановкой их на дифференциально-диагностический ряд, состоящий из среды Хью-Лейфсона, среды Гисса с глюкозой и полужидкого агара. Наличие некоторых ферментов бактерий, а также ряда продуктов обмена определяли также с помощью различных реактивов. Для определения названных признаков использовали только суточные культуры бактерий.

Представители водных бактерий – наиболее распространенные возбудители болезней рыб – аэромонады, псевдомонады и вибрионы обладают ферментом цитохромоксидазой. Определение этого фермента называется оксидазным тестом: культуру бактерий бактериологической петлей переносили на кусочек фильтровальной бумаги и наносили на него каплю реактива, состоящего из равных частей 1%-го водного раствора диметилпарафенилендиамина и 1%-го спиртового раствора альфанафтола. Оксидазоположительные колонии окрашиваются в синий цвет, оксидазоотрицательные цвета не меняют. Реакцию учитывали в течение 3 мин.

Каталазу определяли следующим образом: на предметное стекло наносили каплю 3%-го раствора перекиси водорода, опускали в нее петлю с бактериальной культурой. При наличии каталазы образуются пузырьки воздуха, при отсутствии – не образуется.

Для проведения теста окисления – ферментации готовили среду Хью-Лейфсона. На 100 мл питательного агара брали 1 г глюкозы, 5 г хлорида натрия, 0,03 г калия фосфорнокислого (K_2HPO_4), 0,3 г бромтимолового синего. К расплавленному питательному агару добавляли фосфат калия и глюкозу и кипятили в течение 2-3 мин.

С помощью 20%-го раствора едкого натра получали рН 7,4-7,5, доводили объем среды до первоначального и добавляли 0,3мл 1%-го водного раствора бромтимолового синего. Среду фильтровали через ватно-марлевый фильтр, разливали по 4-5мл в стерильные пробирки и стерилизовали при 0,5атм в течение 20мин. Цвет среды до стерилизации синий, после автоклавирования – травянисто-зеленый.

Исследуемую культуру пересевали уколом в две пробирки со средой Хью-Лейфсона. В одну из пробирок наливали стерильное вазелиновое масло с высотой столбика не менее 0,5 см (ферментация) Обе пробирки инкубировали в термостате при температуре 22-28°C.

Изменение цвета с травянисто-зеленого до желтого свидетельствует об окислении или ферментации. Возможны четыре варианта реакции: окисление и ферментация (цвет среды в обеих пробирках меняется на желтый), окисление глюкозы без ее ферментации (цвет среды менялся на желтый в пробирке без масла), только ферментация глюкозы (цвет среды менялся на желтый в пробирке с маслом), также бактерии могут не окислять и не ферментировать глюкозу, входящую в состав среды (цвет не меняется в пробирках). Кроме того, бактерии могут расщеплять глюкозу в аэробных условиях с образованием щелочных продуктов, тогда наблюдается синее окрашивание верхней части столбика среды. Посевы инкубировали 4 дня.

Ферментацию углеводов изучали на среде Гисса с глюкозой. Исследуемые суточные культуры бактерий высевали на данную среду. Желтое окрашивание среды свидетельствовало о расщеплении глюкозы. При образовании газа происходит разрыв и вспенивание среды.

Отношение к кислороду и подвижность бактерий определяли на ПЖА. В столбике с полужидким агаром аэробы растут поверхностной пленкой (до 2 мм), факультативные анаэробы – равномерно по всему уколу, диффузно внутри среды и на поверхности, облигатные анаэробы - в нижней части укола, на дне столбика. Подвижные бактерии на ПЖА растут по уколу и на поверхности среды. Неподвижные бактерии растут в нижней части укола. Кроме определения подвижности и отношения бактерий к кислороду, ПЖА использовали для временного хранения выделенных культур бактерий в условиях холодильника.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ РАБОТЫ.

ЗАПРЕЩАЕТСЯ прикасаться руками к исследуемому материалу и культурам микробов. Все необходимые операции с названными объектами проводятся только с использованием специальных инструментов.

ЗАПРЕЩАЕТСЯ переливать жидкости, содержащие живые клетки микроорганизмов, из одного сосуда в другой; оставлять на столах нефиксированные мазки, открытую посуду с посевами.

Лабораторная работа № 4. Идентификация бактерий до рода.

Цели лабораторного занятия: по совокупности культуральных, морфологических и биохимических признаков определяли бактерий до рода с помощью определителя Берджи.

План проведения занятия:

1. Определить подвижность бактерий и отношение к кислороду.
2. Определить тест окисления и ферментации на среде Хью – Лейфсона.
3. Определить сбраживание глюкозы на среде Гисса.
4. Написать протокол исследования пробы воды.

Оборудование и материалы: вода, спиртовки, скошенный агар, бактериологические петли, пинцеты, питательные среды. Бактериологические краски: раствор генцианвиолета, Люголя, фуксина, спирт, штатив для пробирок, предметные стекла, карандаши по стеклу, сухое мыло, марлевые салфетки, вата, лупа, микроскоп, бактериологические петли, пипетки градуированные на 1–10 мл, фильтры бумажные, термостаты.

Фамилия, имя, отчество, группа

Протокол исследования пробы воды

(указывается, где взята проба, температура воды, метеорологические условия, дата взятия пробы, час взятия пробы)

1. - Отмечают последнее разведение, где отмечался рост на МПБ при 37°C.
- Отмечают последнее разведение, где отмечался рост на МПБ при 22°C.
- Отмечают последнее разведение, где отмечался рост на ЛББ при 42°C.

Результат теста на свежее фекальное загрязнение воды.

2. Микробное число на агаре Эндо.

Последнее разведение, при котором отмечался рост на агаре Эндо. Культуральные, морфологические (форма клеток, наличие спор, грампринадлежность) и физиолого-биохимические (подвижность, отношение бактерий к кислороду — по ГДКА, оксидаза, тест окисления — ферментации, расщепление глюкозы на среде Гисса) признаки бактерий, снятых со среды Эндо. Доминирующий фон.

3. Микробное число на агаре Рябова.

Последнее разведение, при котором отмечался рост на агаре Рябова. Культуральные, морфологические и физиолого-биохимические признаки бактерий, снятых с агара Рябова. Доминирующий фон.

4. Рост бактерий на псевдосель — агаре.

ВЫВОДЫ:

1. Как вы оцениваете уровень органического загрязнения исследуемой пробы воды?

2. Аллохтонная или автохтонная микрофлора доминирует в деструкции органического загрязнения? Какими микроорганизмами представлена?

3. Какие представители санитарно-значимых бактерий формируют доминирующий фон исследуемой пробы воды

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ РАБОТЫ.

ЗАПРЕЩАЕТСЯ прикасаться руками к исследуемому материалу и культурам микробов. Все необходимые операции с названными объектами проводятся только с использованием специальных инструментов.

ЗАПРЕЩАЕТСЯ переливать жидкости, содержащие живые клетки микроорганизмов, из одного сосуда в другой; оставлять на столах нефиксированные мазки, открытую посуду с посевами.

Лабораторная работа № 5. Санитарно-микробиологическое исследование кормов для рыб

Цели лабораторного занятия: определение обсеменности бактериями и плесневыми грибами рыбных кормов.

План проведения занятия:

1. Посев корма методом десятикратных разведений.
2. Посев корма на рыбо-пептонный агар, на среду Эндо, агар Сабуро, Эскулин с хлористым натрием.

Оборудование и материалы: рыбный корм, пробирки, чашки Петри, питательные среды, бактериологические петли, центрифуга, ступки, водяная баня, фильтры, спиртовки, весы, термостаты.

Отбор проб и составление среднего образца осуществляют согласно «Правилам бактериологического исследования кормов», 1975 г. (Приложение 1). Настоящий документ регламентирует единые методы бактериологического исследования кормов животного и растительного происхождения, комбикормов и рыбной муки. Отбор проб для бактериологического исследования проводят в стерильных условиях от каждой упаковочной единицы.

Качество кормов и кормовых компонентов по микробиологическим параметрам оценивают по результатам посева на среды общего назначения, дифференциально-диагностические и селективные среды. От каждой пробы отбирают образец массой 10 г.

Для проведения санитарно-микробиологического анализа проб корма и кормовых компонентов к началу работы готовят необходимый набор стерильной посуды – пробирки, шпатели, пипетки и питательные среды.

Для приготовления серийных разведений используют стерильный физиологический раствор. Высев суспензии корма и кормовых компонентов проводят на рыбо-пептонный агар, псевдосель-агар, агар Эндо, агар Сабуро. Рыбо-пептонный агар применяют для определения общей численности микроорганизмов в корме, псевдосель-агар – для выделения условно-патогенных бактерий рода *Pseudomonas*, агар Эндо – для выявления энтеробактерий, агар Сабуро – для обнаружения микроскопических грибов и кислотоустойчивых бактерий.

Санитарно-микробиологические исследования проб кормов и кормовых компонентов начинают с приготовления 10%-й суспензии корма на физиологическом растворе и приготовления 10-кратных разведений суспензии. В стерильную колбу помещают 10 г предварительно измельченного корма, добавляют 90 мл

физиологического раствора и тщательно встряхивают. Таким образом, получают разведение 1:10. Из верхнего слоя жидкости после оседания взвешенных частиц на центрифуге стерильной пипеткой отбирают 0,5 мл суспензии и переносят в пробирку с 4,5 мл мясо-пептонного бульона, тщательно перемешивают. Получают разведение 1:100. Из пробирки новой стерильной пипеткой отбирают 0,5 мл жидкости и переносят в другую пробирку с 4,5 мл мясо-пептонного бульона, перемешивают. Получают разведение 1:1000.

Аналогично готовят разведения 1:10000, 1:100000, 1:1000000, используя для переноса жидкости новые стерильные пипетки. Из каждого разведения, в том числе из колбы, содержащей только суспензию корма, в стерильные чашки Петри переносят стерильными пипетками по 0,5 мл жидкости, заливают расплавленным и охлажденным до 45°C рыбо-пептонным агаром, слегка приоткрывая чашки во избежание попадания бактерий из воздуха. Все чашки с рыбо-пептонным агаром после застывания среды переворачивают и инкубируют в термостате при 37°C. Из пробирок с физиологическим раствором стерильными пипетками переносят по 0,1 мл жидкости в чашки Петри с агаром Эндо, растирают каплю жидкости стерильным шпателем. Все чашки с агаром Эндо инкубируют в термостате при 37°C. Из пробирок с разведениями 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 и 1:1000000 стерильными пипетками по 0,5 мл жидкости переносят в чашки Петри с агаром Сабуро, растирают стерильным шпателем. Все чашки с агаром Сабуро инкубируют при 28°C. Стерильными пипетками из пробирок с разведениями 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 и 1:1000000 переносят по 0,1 мл жидкости в чашки Петри, содержащие псевдосель-агар, растирают шпателем. Все чашки с псевдосель-агаром ставят в термостат и инкубируют при 37°C. Колбу и пробирки с разведениями, начиная с 1:10, инкубируют в термостате при 28°C.

Подсчет колоний в чашках проводят через 48-72 ч. инкубирования. Колонии сапрофитных бактерий просчитывают через 48 ч. термостатирования при температуре 37°C. Данные о численности микроорганизмов используют для определения общей бактериальной обсемененности кормов. После термостатирования в течение двух суток при разных температурах определяют микробное число (или наиболее вероятное число, НВЧ) – общее число микробов, способных образовывать видимые колонии после засева на плотные питательные среды в пересчете на один грамм корма. Измеряется НВЧ в КОЕ/г. Микробное число – это санитарно-микробиологический показатель общего уровня микробной обсемененности корма.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ РАБОТЫ.

ЗАПРЕЩАЕТСЯ прикасаться руками к исследуемому материалу и культурам микробов. Все необходимые операции с названными объектами проводятся только с использованием специальных инструментов.

ЗАПРЕЩАЕТСЯ переливать жидкости, содержащие живые клетки микроорганизмов, из одного сосуда в другой; оставлять на столах нефиксированные мазки, открытую посуду с посевами

Лабораторная работа № 6. Определение микрофлоры кормов.

Цели лабораторного занятия: определить качественный и количественный состав микрофлоры кормов.

План проведения занятия:

1. Определить культуральные, морфологические и биохимические признаки выделенных бактерий.
2. Определить бактерий и плесневые грибы до рода.
3. Составить протокол исследования корма для рыб

На каждой из сред выделяют разнотипные колонии и описывают их культуральные признаки (форма, размер, цвет, структура, поверхность колонии и т.д.).

Культуральные признаки – это характер роста бактерии на различных средах общего назначения. Учитывают их через сутки после посева и далее в течение установленного периода инкубирования микроорганизмов.

При культивировании бактерий на жидких средах отмечают степень помутнения среды, наличие и характер поверхностной пленки и осадка (пленка тонкая, толстая, слизистая, морщинистая, окрашенная, кольцо на стенке пробирки; осадок точечный, зернистый хлопьевидный, слизистый, дымчатый).

При культивировании бактерий на плотных средах учитывают:

а) степень развития и характер роста (отсутствие скудный, умеренный, хороший, отдельными колониями, сливной, нитевидный, распространяющийся, коричневый);

б) форму колонии (круглая, овальная, звездчатая, корневидная, волокнистая, хлопьевидная);

в) размер колонии (росинчатые, точечные – диаметр меньше 1 мм, мелкие 1-2 мм, средние 2-4 мм, крупные более 4 мм);

г) край колоний (ровный, волнистый, изрезанный, зубчатый, бахромчатый, локонообразный, бухтообразный, лопастной, изъеденный, ворсинчатый, ползучий);

д) поверхность колоний (гладкая, шероховатая, складчатая, волнистая, блестящая, матовая, узорчатая, зернистая, изрытая, сухая, влажная);

е) рельеф колонии (плоский, приподнятый, выпуклый, вогнутый, вдавленный);

ж) консистенцию колоний (слизистая, вязкая, крошковатая);

з) прозрачность колоний (прозрачная, полупрозрачная, опалесцирующая или мутная, темная);

и) пигментообразование (окраска среды вокруг колонии или самой колонии);

к) внутреннюю структуру колоний (однородная, зернистая, радиально или концентрически исчерченная);

л) цвет колоний (бесцветные, синеватые, серые, белые, желтые, оранжевые или другие).

При культивировании бактерий на средах с желатином помимо характера роста определяют наличие протеолитических ферментов бактерий. Учитывают следующие признаки:

- а) рост по уколу (в виде ленты, нити, гвоздя со шляпой, равномерный, прерывистый, поверхностный);
- б) разжижение желатины (чашечкой, воронкой, гвоздем, цилиндром, кратером, чулком, послойное, пузырчатое в глубине, поверхностное);
- в) скорость разжижения (быстро, медленно);
- г) изменение окраски среды (зеленая, синяя и др.).

Из выделенных колоний готовят фиксированные мазки и окрашивают их по Граму. С помощью данной методики определяют морфологические признаки бактерий.

Грампринадлежность бактерий также определяют с помощью экспресс-методики. На обезжиренное предметное стекло наносят каплю 6%-го водного раствора едкого калия. Бактериологической петлей отбирают большое количество культуры, опускают ее в щелочь и на другой половине предметного стекла растирают круговыми движениями. Грампринадлежность определяют по появлению вязких тяжей.

Для выделенных колоний определяли наличие оксидазы и каталазы. Для проведения оксидазного теста на предметное стекло накладывают фильтровальную бумагу, наносят каплю смеси 1% спиртового α -нафтола и 1% водного N-диметилпарафенилендиамина, растирают в ней бактериологическую культуру. Наличие оксидазы устанавливают по цвету бактериальной культуры.

Для проведения теста на каталазу используют 3,5%-ный раствор перекиси водорода. В маленькую каплю перекиси на предметном стекле вносят бактериальную культуру. Каталазу выявляют по газообразованию.

Для родовой дифференциации бактерий используют набор сред, позволяющий определить физиологические и биохимические признаки бактерий. Набор обычно включает агар Клиггера, полужидкий агар, среду Хью-Лейфсона, среду Гисса с глюкозой.

Таксономическую принадлежность бактерий определяют согласно Определителя бактерий Берджи. При определении допустимых уровней микробной обсемененности кормов руководствуются действующими законодательными требованиями (Единые ветеринарно-санитарные требования, Правила бактериологического исследования кормов и др.).

Оценку санитарного состояния кормов их компонентов по уровню общей бактериальной обсемененности проводят по «Правилам бактериологического исследования кормов».

Совокупную оценку кормов и компонентов осуществляют по комплексу показателей. Для заключения о роли кормов для рыб в возникновении инфекционного процесса, используют данные о наличии в образцах условно-патогенной микрофлоры и энтеробактерий. Обнаружение представителей последней группы, как санитарно-показательных микроорганизмов, кроме того, могло служить показателем фекального загрязнения кормов. Данные о численности и таксономической принадлежности микроскопических грибов используют для заключения о процессах порчи в кормах.

ПРАВИЛА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КОРМОВ

(Утверждены Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 10 июня 1975 г.)

1. Отбор проб и составление среднего образца

Отбор проб проводят сухим, стерильным пробным щупом. После взятия проб от каждой партии пробный щуп очищают и дезинфицируют. Масса первичной пробы должна быть не менее 100 г.

Для бактериологического исследования от каждой партии корма составляют два средних образца весом не менее 500 г. Один из них направляют в лабораторию, а другой сохраняют на предприятии (хозяйстве) до окончания исследования.

2. Методы бактериологического исследования

ИССЛЕДОВАНИЯ НА САЛЬМОНЕЛЛЫ

Метод последовательного обогащения.

Навеску исследуемого материала 50-200 г (50 г от 10 и менее, 100 г от 10 до 100 и 200 г от 101 и выше упаковочных единиц) измельчают в стерильной фарфоровой ступке и вносят в колбу, содержащую среду предварительного обогащения (пептонная вода, МПБ с содержанием 5% маннита) при соотношении материала и среды 1:5.

Содержимое колбы тщательно перемешивают и ставят в термостат при температуре 37° С.

Через 16-18 часов производят посевы на бактериологические чашки с твердыми дифференциально-диагностическими средами: висмут-сульфит агар, средой Плоскирева или Левина (по две чашки) и на две (по выбору) основные среды обогащения (селенитовый бульон, магниевую среду, среды Киллиана, Мюллера, Кауфмана) в соотношении 1:5. Лучшими являются селенитовый бульон и магниевая среда.

После 16-18-часового выдерживания в термостате при 37 °С из обогатительных сред бактериологической петлей производят вторично посевы на чашки с твердыми дифференциально-диагностическими средами, которые помещают в термостат при 37°С. Засеянные чашки просматривают через 16, 24, 48 часов.

На висмут-сульфит агаре *S.typhi* и *S. paratyphi A* растут в виде мелких, нежных, серовато-зеленых колоний с черным центром; *S. cholerae suis* - в виде зеленых колоний. Колонии почти всех других сальмонелл значительно крупнее, темно-коричневого цвета с металлическим блеском, окруженные светлым ореолом, цвет участка среды под колонией черный.

На среде Плоскирева сальмонеллы растут в виде прозрачных или нежно-розовых колоний, на среде Левина - в виде прозрачных, бледных, нежно-розовых или розовато-фиолетовых колоний.

В случае обнаружения колоний, подозрительных на сальмонеллы, 3-5 из них засевают на комбинированную среду Ресселя или на двухсахарный (лактоза, глюкоза) агар, а лучше на трехсахарный (лактоза, глюкоза, сахарозам) "скошенный столбик" с мочевиной.

Высев колоний из чашек также делают на короткий пестрый ряд, включающий скошенный агар и среды Гисса с лактозой, глюкозой и сахарозой, а также на бульон Хоттингера для определения индола и сероводорода.

Для определения подвижности культуры производят посев уколом в полужидкий агар (0,3-0,5 %).

На среде Ресселя и "скошенный столбик" посевы делают сначала штрихом на скошенной поверхности, а затем уколом в глубину столбика. При разложении мочевины в "скошенном столбике" окраска среды меняется на оранжевую при индикаторе ВР и на коричнево-фиолетовую при индикаторе тимоловый синий в сочетании с индикатором Андреде. Посевы выдерживают в термостате при температуре 37°C 16-18 часов.

Культуры, ферментирующие лактозу, глюкозу и сахарозу с образованием газа и расщепляющие мочевины, отбрасывают.

Культуры, не ферментирующие лактозу и сахарозу и не расщепляющие мочевины, подлежат дальнейшему исследованию. Изучают морфологию культуры в мазке, окрашенном по Граму, и подвижность (в висячей или раздавленной капле или в полужидком агаре).

Культуры грамотрицательных подвижных палочек, ферментирующие глюкозу с образованием газа, не ферментирующие лактозу и сахарозу, не разлагающие мочевины и не образующие индол, подвергаются серологическому исследованию в реакции агглютинации на предметном стекле с набором агглютинирующих сывороток.

Для реакции агглютинации используют культуры, выращенные на среде Ресселя или на двухсахарном или трехсахарном агарах. При этом для реакции агглютинации с О-сыворотками культуру следует брать из верхней части скошенного агара, а для агглютинации с Н-сыворотками - из самой нижней части (конденсационной воды), где микробы наиболее подвижны.

Исследование культуры начинают реакцией агглютинации с поливалентной адсорбированной О-сывороткой основных серологических групп А, В, С, О, Е.

На предметное стекло наносят каплю сыворотки и культуры, тщательно смешивают и в течение 2 мин. наблюдают склеивание (агглютинацию) частиц. Культуры, дающие положительную реакцию агглютинации с поливалентной

сывороткой, также проверяют с монорецепторными агглютинирующими сыворотками. Сначала с помощью монорецепторных О-сывороток устанавливают принадлежность культур к той или иной серологической группе, остановив серологическую группу, к которой отнесена данная культура, последнюю проверяют монорецепторными Н-сыворотками сначала первой фазы, а потом второй, определяя таким образом серологический тип бактерий в соответствии со схемой Кауфмана - Увита.

ИССЛЕДОВАНИЯ НА ЭНТЕРОПАТОГЕННЫЕ ТИПЫ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ

50 г корма помещают в колбу, содержащую 500 мл стерильного физиологического раствора, встряхивают на шуттель-аппарате в течение 30 минут и из полученной взвеси стерильными пипетками готовят разведения 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000.

По 1 мл каждого разведения вносят в пробирки (по выбору) со средами Эйкмана, Кесслера или Кода. Посевы помещают в термостат при температуре 43°C для первых двух сред и при 37°C - для последней.

Через 24 часа учитывают рост: на среде Эйкмана - по помутнению среды и образованию газа, на средах Кесслера и Кода - по изменению цвета сред. Титр кишечной палочки устанавливают по наибольшему разведению, в котором еще наблюдался ее рост.

Из пробирок, где наблюдается рост микробов, производят посев на плотные дифференциально-диагностические среды Эндо, Левина в бактериологических чашках, разделенных на секторы для каждого разведения.

Типичные колонии *E. coli* характеризуются круглой формой, гладкой, выпуклой или слегка приподнятой в центре поверхностью, ровными краями, розового, красного или малинового цвета с металлическим блеском или без него на среде Эндо или черного цвета на среде Левина.

Выросшие изолированные колонии S-формы (не менее 4) пересевают на МПБ, выдерживают в термостате при температуре 37°C в течение 16-24 часов. После этого одну часть пробирок используют для приготовления мазков, посева на дифференциально-диагностические среды, заражения мышей; вторую - для приготовления автоклавированного антигена, если кипяченный антиген не будет агглютинироваться поливалентными (комплексными) коли-сыворотками.

У выделенных культур определяют морфологические и культурально-биохимические свойства с целью проведения их родовой дифференциации, как указано в приложении 1.

Морфологию бактерий изучают в мазках, окрашенных по Граму, подвижность определяют по характеру роста в 0,3%-ном полужидком МПА.

Для определения культурально-биохимических свойств бактерий используют набор питательных сред, куда входят среды с углеводами и индикатором Андрее (лактоза, глюкоза, сахароза, маннит, дульцит, аденин, инозит), среда Кларка, нитратно-аммонийная среда, МПЖ, среда с мочевиной, МПБ или бульон Хоттингера и агар с глюкозой и сернокислым железом.

Патогенные свойства кишечной палочки определяют путем постановки биологической пробы на белых мышах. С этой целью внутрибрюшинно заражают трех мышей массой 14-16 г смывом с суточных агаровых культур, в дозе 500 млн. микробных тел. Концентрацию бактерий устанавливают по бактериальному стандарту. Культуру признают патогенной в случае гибели одной или более мышей в первые четверо суток после заражения.

См. в полном варианте документа серологическую типизацию культур кишечной палочки по O-антигену с целью установления энзоотических типов.

ИССЛЕДОВАНИЯ НА АНАЭРОБЫ

50 г корма растирают в стерильной ступке с физиологическим раствором и засевают в несколько пробирок со средой Китта-Тароцци, молоком и по две чашки со средами Вильсона - Блера и кровяным агаром по Цейслеру. Для уничтожения вегетативных форм по одной пробирке с жидкими средами прогревают при температуре 80°C в течение 20 минут. Посевы помещают в термостат при температуре 37°C. Чашки должны находиться в специальных аппаратах для анаэробных культур или в эксикаторе, куда заранее вносят тот или иной поглотитель кислорода.

Результаты посевов регистрируют в первый же день. Почернение среды Вильсона - Блера в течение 1-3 часов после посева, свертывание молока с образованием ноздревато-губчатого сгустка и прозрачной сыворотки в течение 6 часов, а также быстрое начало роста на среде Китта - Тароцци (через 4-5 часов) при обильном газообразовании является характерным для клостридий перфрингенс.

Рост клостридий ботулинум, наблюдаемый обычно на 2-3-й день, характеризуется помутнением среды Китта - Тароцци, образованием осадка и запахом прогорклого масла.

При обнаружении роста на среде Китта - Тароцци производят микроскопическое исследование и выделение чистой культуры посевом на 2-3 чашки с кровяным агаром по Цейслеру, которые выдерживают в анаэробных условиях при температуре 37°C в течение 24-48 часов, после чего просматривают рост в чашках и отбирают культуры, которые классифицируют по морфологическим и биохимическим свойствам, указанным в приложении 2.

Биологическую пробу проводят на морских свинках или белых мышах путем внутрибрюшинного заражения бульонной культурой. При положительном результате подопытные животные гибнут через 12-48 часов.

См. в полном варианте документа опыт нейтрализации токсина специфической сывороткой и исследование кормов на ботулизм (наличие токсинов)

3. ОЦЕНКА КОРМОВ

3.1. Комбикорм используют сельскохозяйственным животным при отрицательных результатах исследования на сальмонеллы, энтеропатогенные

типы кишечной палочки и токсинообразующие анаэробы при условии его соответствия другим показателям действующих стандартов.

3.2. Мясо-костную и рыбную муку используют сельскохозяйственным животным при общей бактериальной обсемененности не более 500 тыс. микробных тел в 1 г и отрицательных результатах исследования на сальмонеллы, энтеропатогенные типы кишечной палочки и протей, а также токсинообразующие анаэробы при условии соответствия другим показателям действующих стандартов.

При обнаружении сальмонелл, энтеропатогенных типов кишечной палочки и протей корм запрещается использовать животным без дополнительной обработки. Вторичную стерилизацию проводят в соответствии с технологическими режимами производства этих кормов или же этот корм подвергается проварке при температуре не ниже 100 С в течение 1 часа и дальнейшей обработке согласно установленному технологическому режиму приготовления кормов к скармливанию.

3.3. При установлении в кормах анаэробных микроорганизмов и их токсинов такие корма запрещается использовать животным без дополнительной термической обработки, которую проводят при температуре 120-130°С в течение 2 часов. После стерилизации корма подвергают бактериологическому исследованию с постановкой биопробы на наличие анаэробов и их токсинов и при получении отрицательных результатов они могут быть использованы на кормовые цели. При положительных результатах исследования эти корма уничтожают.

3.4. Корма, производство которых связано с тепловой обработкой, имеющие бактериальную обсемененность свыше 500 тыс. микробных клеток в 1 г, при отсутствии патогенных микроорганизмов подлежат повторной стерилизации согласно технологическим инструкциям или могут быть направлены для производства гранулированных кормов с термической обработкой, а также проварке, как указано в п. 3.2. настоящих правил.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ РАБОТЫ.

ЗАПРЕЩАЕТСЯ прикасаться руками к исследуемому материалу и культурам микробов. Все необходимые операции с названными объектами проводятся только с использованием специальных инструментов.

ЗАПРЕЩАЕТСЯ переливать жидкости, содержащие живые клетки микроорганизмов, из одного сосуда в другой; оставлять на столах нефиксированные мазки, открытую посуду с посевами

Протокол исследования пробы корма

1. Последнее разведение, где отмечался рост на МПБ при 28°C.

2. Последнее разведение, где отмечался рост на МПА при 37°C.

Общее микробное число. Культуральные признаки, снятых колоний бактерий с МПА. Результаты анализа на Грам-принадлежность и на каталазу выделенных бактерий. Доминирующий фон на МПА.

3. Последнее разведение, где отмечался рост на агаре Эндо при 37°C.

Общее микробное число. Культуральные признаки, снятых колоний бактерий с агара Эндо. Результаты анализа на Грам-принадлежность и на оксидазу выделенных бактерий. Доминирующий фон на агаре Эндо.

4. Последнее разведение, где отмечался рост на агаре Сабуро при 28°C.

Следует указать присутствие или отсутствие роста грибов и дрожжей на агаре Сабуро и таксономическую принадлежность обнаруженных плесневых грибов.

5. Последнее разведение, где отмечался рост на среде эскулин + хлорид натрия при 37°C. Результаты теста гидролиза эскулина грамположительными бактериями.

ВЫВОДЫ:

1. Какова общая характеристика микробной обсемененности кормов?

2. Какие виды микроорганизмов доминируют в данной пробе корма?

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ РАБОТЫ.

ЗАПРЕЩАЕТСЯ прикасаться руками к исследуемому материалу и культурам микробов. Все необходимые операции с названными объектами проводятся только с использованием специальных инструментов.

ЗАПРЕЩАЕТСЯ переливать жидкости, содержащие живые клетки микроорганизмов, из одного сосуда в другой; оставлять на столах нефиксированные мазки, открытую посуду с посевами

Заключение

В ходе проведения лабораторных занятий студенты выполняют идентификацию бактерий по культуральным, морфологическим, физиолого-биохимическим признакам.

Осваивают методы санитарно-бактериологического исследования воды открытых водоисточников, учатся определять качество воды. Проводят санитарно-бактериологическое исследование рыбных кормов. Определяют обсемененность бактериями и плесневыми грибами рыбных кормов

Оценивают качество рыбных кормов.

Список рекомендуемой литературы

1. Санитарная микробиология: учеб. пособие / Р. Г. Госманов, А. Х. Волков, А. К. Галиуллин. - Санкт-Петербург [и др.]: Лань, 2010. - 237 с.
2. Волкова, И. В. Оценка качества воды водоемов рыбохозяйственного назначения с помощью гидробионтов: учеб. пособие / И. В. Волкова, Т. С. Ершова, С. В. Шипулин. - Москва: КОЛОС, 2009. - 349 с.
3. Егоров, В. В. Экологическая химия: учеб. пособие / В. В. Егоров. - СанктПетербург [и др.]: ЛАНЬ, 2009. - 181 с.
4. Таксономия микроорганизмов и методы их идентификации: учеб. пособие для студ. вузов по напр. 561100 и спец. 311700 - Вод. биоресурсы и аквакультура / Калинингр. гос. техн. ун-т; Е. В. Авдеева [и др.]. - Калининград: КГТУ, 2003. - 88 с.

Локальный электронный методический материал

Елена Витальевна Авдеева

САНИТАРНАЯ ГИДРОБИОЛОГИЯ

Редактор И. В. Голубева

Уч.-изд. л. 2,2. Печ. л. 2,0.

Издательство федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Калининградский государственный технический университет».
236022, Калининград, Советский проспект, 1