

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

Е. В. Авдеева

МИКРОБИОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ

Учебно-методическое пособие по лабораторным занятиям для студентов,
обучающихся в бакалавриате по направлению подготовки
36.03.01 Ветеринарно-санитарная экспертиза

Калининград
2023

УДК 574.63(076)

Рецензент

кандидат биологических наук, доцент кафедры водных биоресурсов и
аквакультуры ФБОУ ВО «КГТУ» Е.А. Масюткина

Авдеева, Е. В.

Микробиология и иммунология: учеб.-методич. пособие по лабораторным занятиям для студ. бакалавриата по напр. подгот. 36.03.01 Ветеринарно-санитарная экспертиза / **Е. В. Авдеева.** – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВО «КГТУ», 2023. – 60 с.

В учебно-методическом пособии по лабораторным занятиям по дисциплине «Микробиология и иммунология» представлены методические материалы по подготовке к лабораторным занятиям.

Локальный электронный методический материал. Учебно-методическое пособие. Рекомендовано к использованию в учебном процессе методической комиссией института рыболовства и аквакультуры ФГБОУ ВО «КГТУ» «25» сентября 2023 г., протокол № 17

Рекомендовано к использованию в учебном процессе методической комиссией института агроинженерии и пищевых систем ФГБОУ ВО «КГТУ» «30» сентября 2023 г., протокол № 07

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
1. Лабораторное занятие № 1. Ознакомление с микробиологической лабораторией, оборудованием и техникой безопасности. Приготовление питательных сред. Тепловая стерилизация и подготовка посуды к ней.....	5
2. Лабораторное занятие № 2. Методы исследования микроорганизмов. Посев чистых культур бактерий и грибов на плотные питательные среды.....	15
3. Лабораторное занятие № 3. Морфологические и культуральные признаки бактерий. Простые и сложные методы окраски. Приготовление фиксированного препарата, окраска по Граму и микроскопия бактерий.....	24
4. Лабораторное занятие № 4. Дрожжевые и плесневые грибы: культуральные и морфологические признаки (окраска и микроскопия).....	33
5. Лабораторное занятие № 5, 6. Санитарно-бактериологические исследования объектов внешней среды (водопроводной воды и воздуха). Учет результатов посевов водопроводной воды и воздуха. Оформление протоколов исследования.....	40
6. Лабораторное занятие № 7, 8. Биохимические процессы, вызываемые микроорганизмами: спиртовое, молочнокислое, маслянокислое брожение. Аммонификация белков. Анализ результатов спиртового, молочнокислого, маслянокислого брожения и аммонификации белков. Исследование микрофлоры свежего и испорченного мяса методом препаратов-отпечатков.....	47
7. Лабораторное занятие № 9, 10, 11. Анализ результатов санитарно-микробиологического исследования кормов для животных. Выделение доминирующих типов колоний бактерий и пересев на дифференциально-диагностические среды. Идентификация выделенных культур бактерий. Определение доминирующего микробного фона кормов. Оформление протокола исследования.....	50
Приложение 1.....	54

ВВЕДЕНИЕ

Дисциплина «Микробиология и иммунология» используется при изучении профессиональных дисциплин по болезням сельскохозяйственных животных, кормопроизводству, основам ветеринарии и в процессе профессиональной деятельности.

Целью освоения дисциплины является формирование знаний у студентов знаний о группах микроскопических организмов, их свойствах, роли в природе, практической деятельности человека, возникновении инфекционных заболеваний животных

Задачи изучения дисциплины:

- изучение морфологии, физиологии, систематики, генетики и эволюции вирусов, бактерий и микроскопических грибов;
- приобретение знаний об особенностях микробного метаболизма и роли микробов в круговороте веществ, повышении плодородия почвы, продуктивности животных, в получении кормов, продуктов питания, биологически активных веществ и их сохранении;
- формирование знаний об инфекции и иммунитете, возникновении и развитии инфекционного процесса, факторах патогенности и вирулентности бактерий, видах иммунитета и механизмах развития иммунных реакций.

В результате изучения дисциплины студент должен:

знать:

- морфологию и физиологию микроорганизмов, влияние факторов внешней среды на развитие микробов;
- роль микроорганизмов в круговороте биогенных веществ;
- систематику, генетику и эволюцию вирусов, бактерий и микроскопических грибов;
- основы учения об инфекции и иммунитете.

уметь:

- провести санитарно-микробиологическое исследование продуктов животноводства, почвы, воды, воздуха, технологического оборудования;
- выделить и идентифицировать различные группы бактерий и микроскопических грибов.

владеть:

- методами идентификации групп микроорганизмов;
- навыками работы с живыми культурами микробов, микроскопическими препаратами, с питательными средами, лабораторным микробиологическим оборудованием;
- специфическими правилами техники безопасности работы с микроорганизмами;
- навыками применять знания в области микробиологии и иммунологии животных при проведении анализов общеклинических показателей органов и систем организма животных

1. Лабораторное занятие № 1. Ознакомление с микробиологической лабораторией, оборудованием и техникой безопасности. Приготовление питательных сред. Тепловая стерилизация и подготовка посуды к ней.

Цель занятия: получение умений по правилам работы в микробиологической лаборатории, по применяемым в ней средам и навыков подготовки лабораторной посуды к тепловой стерилизации.

Задание: законспектировать правила работы в микробиологической лаборатории в тетрадь. Подготовить чашки Петри и пипетки к тепловой стерилизации.

План занятия:

1. Ознакомиться с основными подразделениями и размещением лаборатории, общими правилами работы в лаборатории.
2. Изучить лабораторное оборудование, основные принципы работы приборов.
3. Приобрести навыки приготовления питательных сред, подготовки лабораторной посуды для микробиологических исследований.

Оборудование и материалы: пробирки бактериологические, шпатели Дригальского, пастеровские пипетки, ватно-марлевые пробки, штативы для пробирок, чашки Петри, колбы на 500 и 1000 мл, мерные цилиндры на 100 мл, пипетки градуированные на 1 и 10 мл, ручные дозаторы, воронки, фильтровальная бумага, вата, марлевые салфетки, индикаторная бумага для определения pH, дистиллированная вода, сухие готовые питательные среды, химические реактивы, красители, горелки газовые или электроплитки, водяные бани, весы электронные, световой микроскоп, люминесцентный микроскоп, термостат, автоклав, бактерицидная установка, центрифуга, pH-метр, дистиллятор.

Теоретическая часть

В составе лаборатории выделяют следующие помещения.

1. Комната кабинетного типа, где проводят обработку результатов работ и при необходимости – некоторые лабораторные исследования, например, микроскопию фиксированных препаратов.
2. Комната для исследований.
3. Препараторская. В этой комнате размещают основное оборудование лаборатории. Микробиологический отдел лаборатории включает ряд помещений, где проводят работу с микроорганизмами. Кроме основного рабочего помещения, лаборатория имеет стерилизационную, где размещены автоклавы и сушильные шкафы, бокс, моечную, комнату для приготовления питательных сред и реактивов. Для проведения стерильных работ бокс может быть оборудован в комнате для лабораторных работ. Воздух и поверхность

предметов в боксе должны быть стерильны. С этой целью помещение бокса герметизируют, а бокс оборудуют бактерицидными лампами. Бокс служит для работы с культурами микроорганизмов и представляет собой небольшую изолированную комнату, разделенную перегородкой на две части (собственно бокс и предбоксник). Оборудование бокса состоит из стола, стула, газовой горелки (или спиртовки) и бактерицидной лампы настенного или настольного типа. Удобно иметь в боксе приставной столик, на котором размещают необходимые во время работы предметы. Рабочее место, где непосредственно проводится работа с культурами микроорганизмов, требует особенно тщательной обработки. Рабочий стол до и после окончания работы дезинфицируют 70%-м раствором этилового спирта или растворами хлорсодержащих препаратов (хлорамина Б и других).

Воздух в лаборатории наиболее просто дезинфицировать проветриванием. Продолжительная вентиляция помещения (в течение 30–60 мин) приводит к резкому снижению количества микроорганизмов в воздухе, особенно при значительной разнице в температуре между наружным воздухом и воздухом в помещении. Более эффективный и надежный способ дезинфекции воздуха – облучение ультрафиолетовыми лучами с длиной волны от 200 до 400 нм. Эти лучи обладают высокой антимикробной активностью и могут вызвать гибель не только вегетативных форм микроорганизмов, но и спор. В бокс входят через предбоксник, где надевают чистый халат. Там же размещают шкаф для хранения стерильной посуды. При отсутствии отдельного помещения для бокса используют ламинарные шкафы или боксы настольные. Правила работы и техника безопасности в лаборатории при обращении с культурами микроорганизмов и гельминтами регламентируются СП 1.2.731-99 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности и гельминтами» (Минздрав России, Москва, 1999). Каждый сотрудник лаборатории должен иметь закрепленное за ним рабочее место. Каждое рабочее место имеет обязательный комплект оборудования: спиртовку.

Оборудование для проведения стерильных работ в лаборатории: ламинарный шкаф, настольный бокс; закрывающиеся контейнеры с дезинфицирующим раствором; банку с дезинфицирующим раствором для использованных предметных и покровных стекол; плотно закрывающуюся банку для хранения чистых, обезжиренных стекол в смеси Никифорова; набор бактериологических петель разного диаметра; лупу пятикратного увеличения; микроскоп. В ящиках стола находится дневной запас стерильных пастеровских и градуированных пипеток разного объема, резиновая груша или пипеточные дозаторы.

Перед началом работы следует надеть халат, который хранится отдельно от верхней одежды. При работе со спиртовкой необходимо иметь под рукой одеяло или плотную ткань для быстрого тушения огня в случае аварии. Насасывание в пипетки растворов химических реактивов и жидкостей, содержащих возбудителей инфекционных заболеваний животных, производят с помощью резиновой груши или автоматических дозаторов. Насасывание ртом

не допускается. Материал для исследования доставляют в лабораторию в контейнерах, биксах или сумках-холодильниках. Емкости с жидкими материалами закрывают пробками, исключая выливание содержимого во время транспортирования. Дно контейнеров, содержащих емкости с патологическим материалом, покрывают адсорбирующим материалом (марлевая салфетка, ткань и др.). Не допускается доставка материала в хозяйственных сумках, чемоданах и других предметах личного пользования. Сопроводительную документацию к направляемому материалу прилагают отдельно, в полиэтиленовом пакете. Для посевов используют бактериологическую петлю, замкнутую в непрерывное кольцо, с плечом не более 6 см. Допускается применение одноразовых промышленно изготовленных петель с большей длиной плеча.

Работа с первичными посевами исследуемого материала и чистыми культурами микроорганизмов проводится вблизи пламени горелки. В процессе работы каждая процедура по взятию или внесению в среду культур микробов или пересеваемого материала сопровождается фламбированием (обжиганием) «горлышка» сосудов (колб, пробирок, флаконов), из которых берут или в которые вносят исследуемый материал. Соответственно перед проведением каждого посева и после него бактериологические петли и стеклянные шпатели прокалывают в пламени горелки. По окончании работы все посевы убирают в термостаты и обязательно проводят дезинфекцию рабочих поверхностей столов. Использованные в работе с инфицированным материалом стеклянные шпатели, пастеровские и градуированные пипетки погружают в емкость с дезинфицирующим раствором.

Отработанный заразный материал помещают в специальные закрывающиеся контейнеры и сдают для дальнейшего обеззараживания в автоклавах. Каждый сотрудник лаборатории должен быть обеспечен индивидуальной рабочей одеждой: медицинскими халатами, сменной обувью, одноразовыми перчатками в соответствии с действующими правилами. До проведения исследований в предбокснике рабочий халат снимают и для работы в боксе надевают новый халат. Смена рабочей одежды проводится по мере загрязнения, но не реже одного раза в неделю. Перед сдачей в стирку защитную одежду обеззараживают. В лаборатории необходимо хранить как минимум недельный запас дезинфицирующих средств.

Вновь поступающие на склад серии дезинфицирующих средств следует контролировать на содержание действующего вещества. На емкости с дезинфицирующим раствором должны быть указаны его название, концентрация и дата приготовления.

Автоклавирование проводится персоналом, имеющим свидетельство об окончании специальных курсов. Текущая уборка помещений проводится ежедневно влажным способом после окончания рабочего дня: в «чистой» зоне лаборатории – с применением моющих средств, в «заразной» зоне – с применением дезинфектантов.

«Чистая» и «заразная» зоны лаборатории обеспечиваются отдельным промаркированным уборочным инвентарем, перенос которого из зоны в зону не допускается. В боксовых помещениях должна проводиться еженедельная генеральная уборка с применением дезинфицирующих средств путем протирания поверхности мебели, приборов, а также стен (на высоту до 2 м). По окончании дезинфекционной обработки и влажной уборки в боксе включают бактерицидные УФ-лампы на 30–60 мин. В последнее время широкое распространение получили установки обеззараживания воздуха, которые могут работать в присутствии людей. Настенные закрытые установки «Аэробакт-10» и «Аэробакт-12», используемые в помещении лаборатории и боксов, изготовлены из кварцевого стекла высокой степени чистоты. Специальное покрытие исключает образование озона и вредных диоксидов в воздухе, обеспечивая УФ-излучение большой мощности, достаточное для разрушения всех микроорганизмов в помещении объемом 60 м³.

При возникновении аварийных ситуаций, таких как разлив инфицированного материала в случае разбивания пробирок и чашек Петри с посевами, а также стеклотары в связи с перепадом температур при работе на автоклаве, немедленно прекращают работу с культурами микроорганизмов и ставят в известность руководителя лаборатории. Все открытые части тела обрабатывают дезинфицирующим раствором или 70%-м раствором этанола. При попадании инфицированного материала на слизистые оболочки их немедленно обрабатывают: глаза – 1%-м раствором борной кислоты, несколькими каплями 1%-го раствора азотнокислого серебра или струей воды; в нос закапывают, а рот и горло прополаскивают 0,05%-м раствором перманганата калия или 1%-м раствором борной кислоты. При аварии, приведшей к повреждениям кожных покровов, перчатки (если работа проводилась в них) обрабатывают дезинфицирующим раствором, снимают их, из ранки выдавливают кровь, руки обрабатывают 70%-м раствором этанола, протирают их тампоном не менее 2 мин, затем моют водой с мылом, ранку смазывают раствором йода. После обеззараживания места аварии защитную одежду замачивают в дезинфицирующем растворе. Для ликвидации последствий аварии, а также профилактики возможного поражения сотрудников в лаборатории необходимо иметь аптечку для оказания экстренной медицинской помощи, запас дезинфицирующих средств, средства индивидуальной защиты (СИЗ), емкости для замачивания СИЗ, которые хранят в специально отведенном месте. Аптечка экстренной помощи должна включать 70%-й этиловый спирт, раствор йода, сухие навески перманганата калия, нитрата серебра и борной кислоты, которые в случае аварии растворяют в мерном объеме дистиллированной воды для получения требуемых концентраций дезинфицирующих средств, стерильную дистиллированную воду, глазные пипетки, ножницы, перевязочные средства, бактерицидный пластырь.

Лабораторное оборудование.

Оборудование, применяемое в лаборатории, делят на группы общего и специального назначения.

Специальное оборудование применяют при определенных методах исследования: бактериологических, вирусологических, микологических, токсикологических.

Оборудование общего назначения используют при разных методах исследования; оно включает микроскопическую технику, устройства для поддержания температуры, аппаратуру для очистки воды, стерилизаторы, центрифуги, рН-метры, фотоэлектроколориметры, спектрофотометры, нефелометры, приборы для взвешивания. Микроскопическая техника

Микроскопические исследования в ихтиопатологии включают изучение возбудителей и тканей рыб при воздействии на них лучей видимой части спектра, ультрафиолетовых лучей и с помощью электронной микроскопии. Для просмотра препаратов в лучах видимой части спектра применяют микроскопы разных марок, например, стереоскопические микроскопы МБС-1 и МБС-2, обеспечивающие прямое и объемное изображение предмета в проходящем и отраженном свете. Эти приборы удобны для изучения патологического материала и мелких возбудителей инвазионных болезней при увеличении в 3,5–88 раз. Микроскопы марок МБИ-2, МББ-1, МБ-6 позволяют рассматривать объекты в проходящем свете при увеличении в 1350–3375 раз. В современной ихтиопатологии все шире применяется особый метод световой микроскопии, названный люминесцентным. Принцип метода заключается в том, что при освещении исследуемого материала ультрафиолетовыми лучами длиной до 360 нм некоторые вещества начинают светиться, испуская лучи видимой части спектра. Первичное свечение материала связано со свечением его собственных компонентов (ядра клеток, цитоплазматические включения). Вторичное свечение возникает при обработке исследуемого материала специальными веществами – флуорохромами. Флуорохромы соединяются с компонентами материала, что позволяет выявить структуры, невидимые при первичном свечении. Метод люминесцентной микроскопии позволяет детально изучить строение возбудителей и тканей рыб, получить цветное изображение объекта и исследовать непрозрачные объекты. В сочетании с иммунологическими методами люминесценция дает возможность более точно установить природу возбудителей при диагностике заболеваний.

Термостат. Для выращивания бактерий и грибов, культивирования вирусов, изучения иммунитета и гистологических исследований необходимо выдерживать материал при постоянной температуре. Приборы, которые автоматически поддерживают определенную температуру воздушной или водной среды в рабочей камере, называют термостатами. Стенки прибора для улучшения теплоизолирующих свойств делают двухслойными. Между стенками находятся воздух или вода.

Для сушки и стерилизации лабораторной посуды применяют сушильные шкафы. Сушильный шкаф принципиально устроен также, как термостаты на 25–60 °С, но приспособлен для создания более высоких температур (200 °С).

Водяные бани и погружные термостаты служат для поддержания определенной температуры водной среды. Во внутренней камере этих приборов находится жидкость, в которую помещают штатив с пробками. Регулировка температуры воды от 30 до 100 °С осуществляется автоматически с помощью контактного термометра, соединенного с электронагревателями. На верхней крышке погружного термостата смонтирован двигатель, приводящий в движение мешалку и насос для перекачки подогретой воды в другие емкости. Поддержание стабильной температуры в открытых емкостях от 25 до 85 °С может быть осуществлено также с помощью погружного термостатирующего устройства УТП-1. Устройство состоит из двух разобщенных блоков: блока нагрева и перемешивания и блока управления.

При отсутствии автоматических нагревающих приборов используют электроплитку, на которую устанавливают металлическую емкость с водой.

Пробирки с пробками и пробирку с термометром помещают в металлическую сетку или штатив и погружают в воду. Затем температуру в бане доводят до необходимой величины, следя за показаниями термометра. Температуру поддерживают на определенном уровне, включая или отключая плитку. Для создания температуры 4–6 °С используют бытовые холодильники. Длительное замораживание материала осуществляют в морозильных камерах бытовых холодильников или в специальных морозильниках, обеспечивающих температуру до -25 °С.

Дистиллятор. Для приготовления питательных сред и растворов реактивов необходимо пользоваться очищенной водой. Одним из распространенных методов очистки воды является перегонка (дистилляция), которая осуществляется с помощью дистилляторов. В камере испарения воду нагревают до кипения. Образовавшийся пар поступает в конденсатор, который охлаждается водопроводной водой, непрерывно протекающей между стенкой конденсатора и наружным стальным кожухом прибора. Сконденсированный пар в виде дистиллята вытекает через ниппель. В верхней части испарительной камеры находятся отражательные, экраны, сепарирующие пар и обеспечивающие чистоту дистиллята. По мере выкипания воды в камере через вентиль поступают новые порции водопроводной воды, уровень которой поддерживается уравниателем. При вирусологических и других исследованиях требуется вода с определенными физико-химическими свойствами. В таких случаях применяют повторную дистилляцию или пропускают воду через ионообменники. Для двукратной перегонки воды используют бидистилляторы БД-2 и БД-4.

Автоклав. При проведении микробиологических исследований необходимо приготовить стерильные питательные среды, растворы реактивов, посуду и т. д. Широко распространенным методом стерилизации является автоклавирование.

Стерилизация в автоклаве осуществляется с помощью нагретого пара под давлением. Материал в металлических биксах или сетках загружают в стерилизационную камеру, которая сообщается с водопаровой камерой. Обе

камеры герметически изолированы от атмосферного воздуха при помощи крышки. В водопаровую камеру заливают дистиллированную воду и после герметизации автоклава нагревают ее с помощью электронагревательных элементов. По достижении необходимого давления пара им заполняют стерилизационную камеру, вытесняя из нее воздух. По окончании продувки вентиль закрывают и давление повышают до требуемой величины, определяемой по манометру. По окончании стерилизации перекрывают сообщение между водопаровой и стерилизационными камерами, выпускают пар и конденсат и специальным приемом подсушивают материал под вакуумом. Затем давление в камере уравнивают с атмосферным и автоклав разгружают. Шприцы и инструменты стерилизуют кипячением в электрических стерилизаторах, которые представляют собой оборудованные электрическим подогревом металлические ванны с крышкой.

Бактерицидный облучатель. Для стерилизации воздуха и поверхности предметов в помещениях лаборатории применяют стационарные и переносные облучатели.

Стерилизацию (необратимые изменения микробных клеток, а затем их гибель) осуществляют с помощью ультрафиолетовых лучей (УФЛ), излучаемых бактерицидной лампой, укрепленной в штативе и соединенной с электропитающим устройством.

Стационарный бактерицидный облучатель устанавливается на потолке или стене.

Передвижной облучатель позволяет устанавливать необходимое расстояние от лампы до объекта, так как лампа с рефлектором подвижно закреплена на вертикальной стойке.

Центрифуга. Для разделения частиц и отделения их от растворителя при обработке патологического материала и культур возбудителей применяют центрифугирование. Принцип работы центрифуги заключается в том, что при вращении пробирок с материалом возникает центробежная сила, отбрасывающая частицы с большей плотностью, чем жидкость, на дно пробирки. Существует большое количество типов и моделей центрифуг. Используют центрифуги с нерегулируемым температурным режимом, рефрижераторные центрифуги и ультрацентрифуги. Все приборы имеют ряд общих элементов: вращающееся приспособление с гнездами для проб (ротор), электродвигатель, регулятор скорости вращения ротора и кожух с крышкой. Для осаждения вирусов и высокомолекулярных соединений применяют ультрацентрифуги, развивающие скорость свыше 25000 об/мин в условиях пониженной температуры и вакуума.

Мерная лабораторная посуда. Особое внимание следует уделить изучению правил работы с мерной посудой: градуированными пипетками, бюретками, мерными стаканами и колбами. При заполнении посуды мениск жидкости устанавливают на уровне деления, от которого начинают отмеривание жидкости. Следует учитывать, что мениск имеет вид темного слоя, имеющего верхнюю и нижнюю поверхности, поэтому различают

соответственно верхний и нижний мениски. Для повышения точности и стандартизации отмеривания жидкостей следует пользоваться нижним мениском, который совмещают с верхним краем необходимого деления шкалы мерного сосуда. Для точного отмеривания жидкостей с помощью градуированных пипеток необходимо установить величины объемов, указанных на шкале пипетки, условием проведения лабораторного исследования является наличие специальной посуды. Для этого находят две соседние цифры на шкале. Поскольку между ними находится 10 делений, то каждое деление соответствует объему $0,2 \text{ мл} : 10 = 0,02 \text{ мл}$. Пятое деление, отмеченное более длинной полосой, соответствует объему 0,1 мл при выпуске жидкости от нулевой отметки. Перед работой с пипетками необходимо определить, как расположена шкала делений. У одних пипеток шкала достигает конца пипетки (концевые пипетки), у других последнее деление шкалы расположено выше конца пипетки (неконцевые пипетки). Способы заполнения пипеток бывают разные.

Насасывания материала ртом следует избегать, желательно пользоваться резиновыми баллончиками или дозаторами для пипеток. При работе с пипетками необходимо плавно набирать и выпускать жидкость из пипетки, прикоснувшись кончиком пипетки к стенке емкости. Глаз работающего должен находиться на уровне мениска жидкости в пипетке. Для мерного разлива небольших объемов растворов при массовых исследованиях очень удобны ручные дозаторы разных типов.

Подготовка лабораторной посуды. В лаборатории для проведения исследований, хранения реактивов, взятия и транспортирования биологических материалов используют разнообразную посуду (колбы, матрасы, чашки Петри, пробирки, пипетки и др.). Она может быть изготовлена как из стекла, так и из различных полимерных материалов. Наряду со стеклянной посудой используют пластиковую посуду промышленного изготовления (как правило, однократного применения и в индивидуальной упаковке). Посуда для микробиологических исследований должна быть химически чистой и стерильной, так как использование загрязненной, плохо вымытой посуды может привести к получению искаженных или неправильных результатов. Пластиковая посуда однократного применения, как правило, поступает в лабораторию чистой, в индивидуальной упаковке и в большинстве случаев в стерильном виде. Следует ориентироваться на применение такой посуды для ежедневных работ, однократного применения - подлежит утилизации.

Мытье новой лабораторной посуды из стекла. Новую посуду из стекла перед использованием моют мыльной водой или 0,5%-м раствором моющего средства. После этого посуду ополаскивают проточной водопроводной водой и кипятят в 1–2%-м растворе соляной кислоты в течение 15–20 мин. После кипячения в растворе кислоты посуду прополаскивают водопроводной, а затем дистиллированной водой. Мытье и обработка посуды, бывшей в употреблении. Загрязненная посуда, а также посуда, в которой содержался инфицированный материал, поступает в мойку после предварительной дезинфекции,

гарантирующей гибель микроорганизмов. Загрязненная посуда помещается в специальные биксы или ведра с крышками, после чего автоклавировается при 126 °С в течение 60 мин или при 132 °С в течение 20 мин. Запрещается освобождать от содержимого использованную посуду без предварительного обеззараживания. Отработанные пипетки обеззараживают в высоком сосуде с полным погружением в дезинфицирующий раствор. Продолжительность обеззараживания зависит от типа применяемого дез. средства. Перед мытьем из пробирок, чашек Петри, колб и другой посуды обеззараженные материалы по возможности выливают в канализацию. Для облегчения дальнейшего процесса мытья после автоклавирования обеззараженную посуду замачивают в 1%-м растворе моющего средства в горячей воде на 1–2 ч, тщательно моют при помощи щеток и ершей и многократно ополаскивают в проточной водопроводной воде. Посуду со следами агара, желатина или иных компонентов питательных сред за сутки перед мытьем можно залить 2–5%-м раствором едкого натра или едкого калия. Очень загрязненную жирную посуду, не поддающуюся мытью обычным способом, следует залить на 30–40 мин хромовой смесью, а затем обильно промыть проточной водопроводной водой и ополоснуть дистиллированной водой (3–4 раза). Затем посуду сушат при комнатной температуре или в сушильном шкафу.

Мытье градуированной посуды. Градуированная посуда должна быть абсолютно чистой и хорошо обезжиренной. На стенках плохо обезжиренной посуды при вливании в нее жидкости остается большое количество капель, вследствие чего слитый объем жидкости не будет соответствовать той величине, которая указана на шкале деления. Это особенно важно при мытье градуированных пипеток объемом 1–2 мл и менее. Мытье новых, не бывших в употреблении, градуированных пипеток нужно проводить следующим образом. С помощью резинового баллона, надетого на пипетку, всасывают в нее горячую мыльную воду, а затем помещают пипетку целиком в сосуд с таким же мыльным раствором. Чтобы вода из пипеток не вытекала, уровень жидкости в сосуде должен соответствовать высоте пипеток. Выдержав пипетки в мыльном растворе в течение 20–30 мин, их следует ополоснуть проточной водопроводной водой и перенести в сосуд с 1–2%-м раствором соляной кислоты. Сосуд затем нужно поставить на слабый нагрев и постепенно довести раствор до кипения. Затем пипетки обрабатывают аналогично остальной стеклянной посуде. Перед мытьем бывших в употреблении обеззараженных пипеток из них удаляют «ваттики» (внутреннюю поверхность пипеток можно протереть при помощи плотно накрученного на конец тонкой упругой проволоки кусочка ваты или марли; закупорившийся канал пипетки прочищают мандреном от тонких игл шприцев или тонкой упругой проволокой), промывают теплой водопроводной водой под давлением и кипятят в 1%-м растворе бикарбоната натрия в течение 45 мин, многократно промывают водопроводной, затем дистиллированной водой. После этого пипетки высушивают, вставляют новые «ваттики» и, поместив в оберточную бумагу или пенал, стерилизуют в суховоздушном стерилизаторе. Сильно загрязненные

пипетки также очищают вначале ершом с раствором моющего средства или соды, а затем погружают в хромовую смесь, налитую в высокий сосуд. Объем смеси по высоте должен соответствовать длине обрабатываемых пипеток. В хромовой смеси пипетки выдерживают 20–30 мин, затем в течение 30 нескольких минут промывают проточной и дважды ополаскивают дистиллированной водой. Для наиболее ответственных работ можно также использовать импортные градуированные пипетки однократного применения из пластмасс. Такие пипетки, как правило, упакованы индивидуально и уже простерилизованы при помощи ионизирующего излучения. Мытье предметных и покровных стекол. Предметные и покровные стекла должны иметь абсолютно чистую поверхность и быть хорошо обезжиренными. Капля воды, нанесенная на обезжиренную поверхность стекла, растекается равномерно. Если же стекло недостаточно обезжирено, то капля распадается на множество мелких капель. Предметные и покровные стекла рекомендуется мыть и ополаскивать в резиновых перчатках, чтобы не загрязнять их жировыми веществами, находящимися на поверхности кожи. Покровные и предметные стекла, не бывшие в употреблении, моют в теплой мыльной воде и после ополаскивания заливают смесью Никифорова. Если стекла, вынутые через 2–3 дня из смеси Никифорова, сохраняют следы жира, то их складывают в фарфоровую чашечку, заливают 2–5%-м раствором гидрокарбоната натрия или едкого натра, ставят на слабый нагрев и кипятят в течение 20–30 мин после закипания. Затем стекла ополаскивают проточной водопроводной водой, опускают на 10–15 мин в 5–10%-й раствор хлористоводородной кислоты и затем промывают проточной водой. Предметные и покровные стекла, бывшие в употреблении и загрязненные краской и иммерсионным маслом, обрабатывают следующим образом: – опускают на 2 ч в концентрированную серную кислоту или хромовую смесь, затем тщательно промывают проточной водопроводной водой; – заливают стекла 5%-м раствором гидрокарбоната натрия или щелочи, ставят на слабый нагрев и кипятят в течение 30–40 мин.

Стерилизация и подготовка лабораторной посуды к использованию. Лабораторную посуду (флаконы, пробирки, колбы и т. п.) закрывают пробками, поверх которых надевают бумажные (или фольгированные) колпачки. Колпачки обвязывают вокруг горлышка ниткой или закрепляют резиновым кольцом. Чашки Петри и пипетки стерилизуют, завернув в оберточную бумагу либо в пеналах. Стерилизацию посуды осуществляют сухим жаром в сушильном шкафу при 160 °С в течение 2 ч (или 180 °С в течение 60 мин) или текучим паром под давлением (1 атм) при температуре 121 °С в течение 30 мин с последующим подсушиванием в сушильном шкафу при отсутствии в автоклаве вакуумной сушки. После стерилизации посуду хранят до использования в закрытом шкафу или ящиках с крышками не более 10 суток при ненарушенной упаковке или невскрытом пенале. Большое применение в микробиологической практике находят пластиковая посуда и расходные материалы преимущественно однократного использования. Пластиковая лабораторная посуда и принадлежности изготавливаются, как правило, из

следующих полимерных материалов: полипропилена, полиэтилена (высокого и низкого давления) и полистирена (полистирола). Ассортимент такой продукции весьма разнообразен: пробирки (с пробками, крышками и т. п.), чашки Петри с крышками (в том числе двух-, трех- и многосекционные), тест-планшеты, пастеровские и обычные пипетки, микробиологические петли и иглы, шпатели, стерильные емкости с приспособлениями для отбора биоматериала.

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.

2. Лабораторное занятие № 2. Методы исследования микроорганизмов. Посев чистых культур бактерий и грибов на плотные питательные среды

Цель занятия: получение умений по методам исследования микроорганизмов и навыков посева чистых культур бактерий и грибов на плотные питательные среды

Задание: законспектировать методы исследования микроорганизмов в тетрадь. Посеять культуру бактерий и плесневых грибов на плотные питательные среды.

План занятия:

1. Изучить методы исследования микроорганизмов.
2. Посев чистых культур бактерий на плотные питательные среды.
3. Посев чистых культур грибов на плотные питательные среды

Оборудование и материалы: пробирки бактериологические, шпатели Дригальского, пастеровские пипетки, ватно-марлевые пробки, штативы для пробирок, чашки Петри, колбы на 500 и 1000 мл, мерные цилиндры на 100 мл, пипетки градуированные на 1 и 10 мл, ручные дозаторы, воронки, фильтровальная бумага, вата, марлевые салфетки, индикаторная бумага для определения pH, дистиллированная вода, сухие готовые питательные среды, химические реактивы, красители, горелки газовые или электроплитки, водяные бани, весы электронные, световой микроскоп, люминесцентный микроскоп, термостат, автоклав, бактерицидная установка, центрифуга, pH-метр, дистиллятор.

Методы исследования живых клеток

А. Препарат «раздавленная капля»

На обезжиренное предметное стекло наносят каплю водопроводной воды и помещают в неё небольшое количество культуры изучаемых микроорганизмов. Взвесь бактерий размешивают и прикрывают покровным стеклом. Капля исследуемого материала должна быть настолько мала, чтобы после прижимания её покровным стеклом не было избытка жидкости, выступающего из-под него. В противном случае избыток жидкости необходимо удалить фильтровальной бумагой, которую затем следует сразу опустить в дезинфицирующий раствор.

Б. Препарат «висячая капля».

Каплю суспензии микроорганизмов биологической петлей наносят на покровное стекло, которое затем переворачивают каплей вниз и помещают над лункой специального предметного стекла (стекло с лункой). Капля должна свободно висеть, не касаясь краев и дна лунки. Края лунки предварительно смазывают вазелином для герметизации камеры.

В. Препарат «отпечаток»

Из агаризованной среды, на которой микроорганизмы растут сплошным газоном или в виде отдельных колоний, вырезают скальпелем небольшой кубик и переносят его на предметное стекло таким образом, чтобы поверхность с микроорганизмами была обращена вверх. Затем к газону или к колонии прикладывают чистое покровное стекло, слегка надавливают на него петлей или пинцетом и тотчас же снимают, стараясь не сдвинуть в сторону. Полученный препарат (покровное стекло) помещают отпечатком вниз в каплю воды или метиленового синего на предметное стекло. Отпечаток можно получить и на предметном стекле, если касаться поверхности колонии предметным стеклом.

Препараты живых клеток рассматривают с «сухими системами» микроскопа. После микроскопирования такие препараты перед мытьем должны быть выдержаны в дезрастворе.

Цитохимические методы исследования строения микробов

А. Окраска капсул и приготовление красителей

а) Окраска капсул

Для окраски капсул применяют методы Михина, Ольта, Ребигера, Романовского-Гимза, Гинса, негативный метод Бурри.

Метод Михина. Фиксированный мазок окрашивают синькой Леффлёра в течение 2-3 мин. при подогревании (до появления паров), после чего краску быстро смывают водой и мазок высушивают между листами фильтровальной бумаги. Клетка окрашивается в темно-синий цвет, капсула – в светло-розовый.

Метод Ольта. Фиксированный препарат окрашивают 2-3%-м водным раствором сафраина в течение 1-3 минут (лучше при подогревании) и быстро промывают водой. Раствор сафраина готовят перед употреблением, растворяя

краску в воде, доведенной до кипения, затем фильтруют через бумажный фильтр. Клетки окрашиваются в красно-коричневый цвет, капсулы - в бледно-желтый.

Метод Ребигера. Окрашивают и фиксируют препарат одновременно формалиновым раствором генцианвиолета. Нефиксированные мазки окрашивают 15-20 сек., быстро промывают водой и высушивают фильтровальной бумагой. Клетки окрашиваются в темно-фиолетовый цвет, капсулы - в красновато-фиолетовый.

Метод Романовского-Гимза. Краску фабричного приготовления перед окрашиванием мазков растворяют из расчета одна капля краски на 1 мл дистиллированной воды. Разведенную краску наливают на дно чашки Петри, в которую кладут две тонкие стеклянные палочки или спички. Мазок, зафиксированный метиленовым спиртом, помещают в чашку до соприкосновения с краской (бактерии находятся на нижней плоскости мазка). Окрашивание проводят 30-40 минут. Препарат промывают водой и высушивают на воздухе в вертикальном положении. Клетки окрашиваются в сине-фиолетовый, а капсулы - в красно-фиолетовый цвета.

Негативный метод Бурри. На обезжиренное предметное стекло наносят каплю туши, разведенную в 10 раз дистиллированной водой. В тушь вносят каплю исследуемой культуры и хорошо смешивают. Полученную взвесь другим стеклом равномерно распределяют по поверхности предметного стекла, высушивают на воздухе. Препарат рассматривают с иммерсией. На темно-дымчатом фоне хорошо видны неокрашенные капсулы и клетки бактерии.

Метод Гинса. На край предметного стекла наносят каплю туши, вносят в неё клетки, хорошо перемешивают и ребром другого стекла делают мазок по всей поверхности стекла. Мазок высушивают на воздухе и фиксируют 5-10 минут жидкостью Никифорова или 3 минуты абсолютным метанолом. Далее мазок окрашивается фуксином Циля, разбавленным водой в соотношении 1:3. Время окрашивания 2-3 мин. Препарат промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют с иммерсией. На темно-сером фоне выделяются розово-малиновые клетки, окруженные бесцветными капсулами.

Окраска капсул бактерий по Муромцеву. На фиксированный мазок наносят краситель Муромцева на 30-40 сек., мазок промывают, высушивают, микроскопируют с иммерсией. Микроскопическая картина - капсулы розовые, бактерии - темно-синие.

б) Приготовление красителей для окраски капсул.

Синька Леффлера. Насыщенный спиртовой раствор метиленовой сини: 1,6 г метиленового синего растворяют в 100 мл 95%-го этилового спирта.

30 мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего смешивают со 100 мл 0,01%-го раствора КОН.

Раствор КОН: 0,01 г КОН развести в 99,99 мл дист. воды.

Раствор сафраина. 3 г сафраина смешать с 97 мл дистиллированной воды, довести до кипения, профильтровать. Краска готовится перед употреблением.

Формалиновый раствор генцианвиолета. 15-20 г генцианвиолета растворить в 100 мл 40%-го формалина, оставить на 6-8 часов при комнатной температуре, профильтровать, после чего он готов к употреблению.

Краситель Романовского-Гимза. Готовый реактив разводят перед употреблением: 1 капля краски на 1 мл дистиллированной воды.

Смесь Никифорова. Этиловый спирт и серный эфир в равных объемах.

Комбинированная краска по Муромцеву. Первый раствор - фуксин основной - 0,15 г, спирт этиловый 96%-й - 20 мл, карболовая кислота кристаллическая (фенол) - 10 г. Второй раствор - метиленовый голубой - 2,5 г, вода дистиллированная - 200 мл. Оба раствора смешивают и фильтруют через бумажный фильтр.

Б. Определение кислотоустойчивости бактерий.

Кислотоустойчивость - свойство, характерное для некоторых микобактерий и нокардий. Оно заключается в сохранении окраски клетками этих бактерий при обработке их кислотой. Кислотоустойчивость связана с особенностью химического состава клеточной стенки этих бактерий: в ней содержится много сложных липидов и миколовых кислот.

На обезжиренном предметном стекле готовят два мазка: исследуемых клеток и клеток кислотоустойчивых микобактерий. Препарат высушивают на воздухе и фиксируют в пламени горелки. На препарат помещают фильтровальную бумагу и заливают карболовым фуксином Циля и затем 2-3 раза подогревают его до появления паров, держа стекло высоко над пламенем горелки. За появлением паров наблюдают, глядя на мазок сбоку; при их появлении тотчас отставляют препарат в сторону. После этого препарату дают остыть, снимают фильтровальную бумагу, сливают краситель и мазок промывают водой. Затем препарат обесцвечивают 5%-ой серной кислотой. Для этого предметное стекло 2-3 раза погружают в стакан с кислотой, не задерживая его в ней. Препарат вновь тщательно промывают водой и докрашивают 3-5 минут синькой Леффлера. Краску сливают, препарат промывают водой, высушивают и исследуют с иммерсией. Кислотоустойчивые клетки приобретают красный цвет, тогда как некислотоустойчивые - синий. Кислотоустойчивость можно определять у клеток любого возраста.

Реактивы для определения кислотоустойчивости.

Фуксин Циля. 5%-й раствор свежеперегнанного фенола 100%, насыщенный спиртовой раствор фуксина основного - 10 мл. Приготовленную смесь отфильтровывают через 48 часов. Краситель устойчив при хранении.

Другой способ получения фуксина Циля: фуксин основной - 1 г, фенол кристаллический - 5 г, спирт 96 %-й - 10 мл, глицерин - несколько капель, вода дистиллированная - 100 мл. Основной фуксин растворяют в этаноле, затем добавляют растворенный в воде фенол. Раствор перемешивают и оставляют на несколько дней. Перед использованием его фильтруют.

В. Окраска спор и приготовление реактивов.

а) Окраска спор

Споры по сравнению с цитоплазмой характеризуются более высоким показателем преломления света, поэтому при микроскопировании в светлом поле они видны как более темные включения округлой или овальной формы. При использовании фазово-контрастного устройства споры имеют вид светлых включений на фоне почти черных клеток.

Эндоспоры обладают многослойными труднопроницаемыми оболочками, поэтому при простой обработке препарата спорообразующих бактерий фуксином или генцианвиолетом споры не окрашиваются. При микроскопировании они обнаруживаются в клетке в виде бесцветных включений. Свободные споры имеют вид колец.

Метод Пешкова. Мазок готовят на обезжиренном предметном стекле, высушивают на воздухе, фиксируют в пламени горелки и заливают раствором метиленовой сини по Леффлёру. Краситель доводят до кипения, держа стекло над пламенем горелки. По мере испарения красителя добавляют новые его порции. Продолжительность окраски, считая с момента закипания, - 10-20 сек. Затем предметное стекло охлаждают, тщательно промывают водой и докрашивают в течение 30 сек. 0,5%-м водным раствором нейтрального красного или сафраина. Краситель сливают, мазок промывают водой и просматривают с иммерсионной системой. При правильном окрашивании клетки имеют красный, а споры - синий цвет. Вместо метиленового синего можно использовать другой краситель - малахитовый зеленый. В этом случае фиксированный препарат заливают на 7-10 минут 7,5%-м раствором малахитового зеленого. Окрашивание проводят с подогревом, помещая препарат над сосудом с кипящей водой или над пламенем горелки. По окончании окраски предметное стекло охлаждают и докрашивают 0,25%-м водным раствором сафраина в течение 1-2 минут. Споры окрашиваются в зеленый цвет, клетки - в розовый.

Метод Циля - Нильсена в модификации Мюллера. На фиксированный над пламенем мазок наливают 5%-й водный раствор хромовой кислоты, которую через 5-10 минут смывают водой. Препарат накрывают полоской фильтровальной бумаги и обильно смачивают карболовым фуксином Циля. Подогревают препарат над пламенем до появления паров, но не до кипения, потом отводят его в сторону и добавляют новую порцию красителя (так в течение 7 минут). При этом важно, чтобы краситель испарялся, но бумага не подсыхала. После охлаждения мазка её снимают, препарат промывают водой и тщательно промокают фильтровальной бумагой. В результате такой обработки клетки со спорами равномерно прокрашиваются. Поэтому для обесцвечивания цитоплазмы препарат затем обрабатывают 1%-м раствором соляной или серной кислоты в течение 15-30 секунд. При превышении этого времени может обесцветиться и спора. Затем препарат промывают водой и докрашивают метиленовым синим 2 мин. Если все операции проделаны правильно, окраска

получиться контрастной и споры ярко-красного цвета будут четко выделяться на голубом фоне цитоплазмы.

б) Реактивы для окрашивания спор бактерий

1. Карболовый фуксин Циля (см. выше).
2. Метиленовый синий Леффлёра (см. выше).
3. Насыщенный водный раствор метиленового синего: 2 г красителя растворить в 100 мл дистиллированной воды.
4. Хромовая кислота, 5%-й раствор.
5. Кислота соляная или серная, 1%-й раствор.
6. Сафраин, водный раствор: 2,5%-й раствор сафраина в 96%-м этаноле - 10 мл, вода дистиллированная - 100 мл.
7. Малахитовый зеленый: малахитгрюн - 7,5 г, вода дистиллированная - 92,5 мл.
8. Метиленовый синий насыщенный спиртовой раствор: метиленовый синий - 3 г, 96%-й спирт - 100 мл. Раствор оставляют на 2-3 дня, несколько раз перемешивают, потом фильтруют. Раствор устойчив.
9. Метиленовый синий по Леффлёру (другой рецепт): 30 мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего растворить в 100 мл дистиллированной воды, добавить 1 мл 1%-го водного раствора КОН.

Г. Окраска жгутиков

а) Приготовление препарата

Отдельный бактериальный жгутик настолько тонок, что неразличим в световом микроскопе, если он не окрашен особым способом, который увеличивает толщину жгутиков. Существует несколько способов окраски жгутиков. Все они основаны на использовании различных протрав, осаждающихся на поверхности жгутиков, благодаря чему диаметр жгутиков увеличивается в диаметре, и они становятся видимыми в световом микроскопе. Окраска жгутиков требует тщательной подготовки культуры и аккуратности в работе, так как жгутики легко обламываются даже при легком взбалтывании культуры.

Для подготовки культуры рекомендуется ежедневно несколько дней подряд делать пересевы культуры на свежую питательную среду в жидкую среду или в конденсационную воду свежей скошенной агаризованной среды. Кроме того, в день просмотра можно брать петлей материал и переносить в пробирку с 5-6 мл стерильной водопроводной воды, нагретой до 37°C. Не рекомендуется болтать петлей в воде, бактериальная масса сама должна в течение 30-60 мин разойтись в ней.

Прежде чем приступить к работе, необходимо проверить подвижность клеток в висячей капле. В случае отсутствия подвижности пробирку оставляют в термостате на 1,5-2 суток.

Для приготовления препаратов необходимы совершенно чистые предметные стекла. Их кипятят в растворе бихромата калия в крепкой серной кислоте, затем дважды промывают в растворе едкого натра. После этого стекла

промывают водой и хранят в банке с 96%-м спиртом. Пред приготовлением мазка следует сильно нагреть ту сторону стекла, на которую будет нанесен мазок, но наносить его надо на охлажденное стекло.

б) Методы окрашивания.

Метод Леффлёра. Суспензию бактерий наносят на стекло пастеровской пипеткой или петлей (3-4 маленьких капли) и сушат при комнатной температуре. Допускается фиксация мазка быстрым одноразовым проведением через пламя. Далее препарат заливают протравой на 3-5 минут при нагревании до появления паров или 15-20 минут при комнатной температуре, потом промывают сильной струей дистиллированной воды 30 сек. и высушивают на воздухе. Окрашивают препарат карболовым фуксином Циля 3-4 минуты при легком нагревании до появления пара (фуксин содержит 1 часть насыщенного спиртового раствора фуксина и 10 частей воды, или в соотношении 1:1). Затем препарат промывают водой и исследуют с иммерсией. Жгутики и клетки бактерий окрашиваются в розовый цвет.

Метод Фонтана. В пробирку с 0,5 мл стерильной водопроводной воды вносят клетки, взятые на границе с конденсационной водой. Материал берут осторожно, слегка касаясь культуры, а не вести биологической петлей по поверхности агара. Петлю с бактериальной массой оставляют в воде на 1 час. За это время подвижные бактерии окажутся свободно взвешенными в воде. Затем петлю вынимают, прокаливают, охлаждают и только после этого ею берут капли взвеси бактерий и осторожно наносят на обезжиренное предметное стекло. Нанесенные капли не размазывают, они должны быстро высохнуть, лучше в термостате. Мазки фиксируют 5 минут жидкостью Руге. Препарат промывают водой, заливают протравой (см. ниже) и подогревают стекло до появления паров в течение 2 минут. Протраву сливают, препарат тщательно промывают водой. Далее обработку препарата проводят серебрением: разбавленный аммиачный раствор серебра наливают на мазок и стекло несколько раз осторожно подогревают в течение 2-х минут до появления паров. Препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсией. Бактерии в препарате окрашены в черный или темно-коричневый цвет, а жгутики (часто спутанные) - в светло-коричневый или желтый.

Метод серебрения жгутиков по Морозову. Препарат готовится, как описано выше. На препарат наливают на 1 минуту реактив №1. Затем его сливают, промывают водой и наливают реактив №2. Подогревают на слабом пламени до появления паров, тщательно промывают водой и 1-2 минуты (при подогревании) обрабатывают препарат реактивом №3 до появления темно-коричневой окраски мазка. Мазок тщательно промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсией.

в) Реактивы для окраски жгутиков.

Приготовление протравы: 12 г танина растворяют при нагревании в 48 мл воды, добавляют 30 мл насыщенного раствора железного купороса $FeSO_4$ и 6 мл насыщенного раствора фуксина в 96%-м спирте. Смесь готовят за несколько

дней до употребления, хранят в склянке с притертой пробкой в темном месте. Перед употреблением фильтруют.

Краситель: карболовый фуксин Циля и дистиллированная вода в соотношении 1:1. Готовят перед употреблением и фильтруют.

Реактив №1: 1 мл ледяной уксусной кислоты, 20 мл формалина 40%-го, 100 мл дистиллированной воды. Это жидкость Руге.

Реактив №2: протрава - танин (5 г), фенол кристаллический (1 г) и дистиллированная вода (100 мл).

Реактив №3 (реактив для серебрения): азотнокислое серебро - 5 г, раствор аммиака, вода дистиллированная - 100 мл. К 3-4 мл 5%-го раствора азотнокислого серебра по каплям прибавляют раствор аммиака до помутнения и образования осадка, а затем осторожно до растворения осадка. После этого вновь прибавляют раствор серебра до появления легкой опалесценции. Полученный раствор аммиачного серебра разводят дистиллированной водой в 10 раз.

Д. Окраска включений клеток микроорганизмов

Окраска гликогена. Гликоген - животный крахмал часто накапливается в клетках дрожжей, бацилл. Для выявления гликогена к капле суспензии клеток на предметном стекле добавляют каплю раствора Люголя. Препарат покрывают покровным стеклом и микроскопируют гранулы гликогенподобных веществ, окрашенные в красновато-коричневый цвет.

Окраска гранулёзы. Гранулеза - крахмалоподобное вещество. Гранулеза в больших количествах накапливается в клетках маслянокислых бактерий. Анализ проводят аналогично выявлению гликогена. Гранулеза окрашивается в синий цвет.

Окраска жира. Жир содержится в клетках почти всех микроорганизмов, особенно много его накапливается при старении культуры.

На предметное стекло наносят небольшую каплю 40%-го раствора формалина. Петлей в каплю вносят культуру микроба. Формалин убивает клетку и разрушает оболочку. Через 5 минут добавляют каплю метиленового синего и спустя 10 минут каплю судана III - индикатора жироподобных веществ. Образовавшуюся общую каплю накрывают покровным стеклом, удаляют избыток жидкости фильтровальной бумагой и микроскопируют с иммерсией. Цитоплазма клеток окрашивается в синий цвет, включения жира - в розово-оранжевый.

Бактерии в качестве резервных липидов образуют гранулы поли-бета-оксимасляной кислоты. Для их выявления готовят фиксированный мазок, окрашивают суданом черным или суданом III в течение 5-15 минут (краситель при этом может высохнуть, но это не имеет значения). Затем краситель смывают, препарат подсушивают фильтровальной бумагой и обрабатывают ксилолом, несколько раз погружая в него препарат. Время просветления препарата в ксилоле не должно превышать 1 минуту. После этого клетки дополнительно окрашивают 0,5%-м раствором сафранина в течение 5-10 сек.

Включения поли-бета-оксимасляной кислоты выглядят как черно-синие гранулы в розовой цитоплазме клеток.

Окраска полифосфатов (волютин, метакроматин). На тонкий, зафиксированный на горелке мазок, наносят метиленовую синь по Леффлеру и окрашивают в течение 10 минут. Краситель сливают, промывают, просушивают, микроскопируют с иммерсией. Клетки окрашиваются в голубой цвет, а зерна волютин - в фиолетово-красный.

Окраска волютина по Омелянскому. На фиксированный в пламени мазок наносят фуксин Циля и окрашивают клетки 0,5-1 минуту. Промывают препарат водой и обесцвечивают 1%-м раствором серной кислоты в течение 20-30 сек. Кислоту сливают, мазок промывают водой и дополнительно докрасивают метиленовым синим (в разведении 1:40) 20-30 сек. Препарат вновь промывают, высушивают, микроскопируют с иммерсией. При правильном окрашивании гранулы волютина имеют красный цвет и хорошо видны на фоне синей цитоплазмы.

Окраска волютина по Муромцеву. Тонкий фиксированный мазок культуры микроба окрашивают краской по Муромцеву 1 минуту. Мазок промывают водой, сушат и микроскопируют с иммерсией. Зёрна волютина окрашиваются в фиолетовый цвет, цитоплазма - в голубой.

Препараты для окрашивания включений.

1. Раствор Люголя для выявления гликогена и гранулезы: йод кристаллический - 1 г, калий йодистый - 3 г, вода дистиллированная - 300 мл.

2. Судан III - 0,5 г, молочная кислота концентрированная - 100 мл.

2-а. 0,1 г судана III растворяют в 200 мл 96%-го спирта или концентрированной молочной кислоты.

3. Судан черный В - 0,3 г, 100 мл 70%-го горячего этилового спирта. Раствор выдерживают несколько часов в закупоренной склянке при 60°C, затем охлаждают и фильтруют.

4. Метиленовый синий 1:40. Насыщенный спиртовой раствор метиленового синего - 1 мл, вода дистиллированная - 40 мл.

Е. Выявление нуклеоида и приготовление реактивов

а) Методы выявления

Метод Романовского-Гимза. Препарат фиксируют метиловым спиртом или фиксатором Карнуа. В последнем случае для удаления следов уксусной кислоты препарат промывают этиловым спиртом и тщательно высушивают на воздухе. Окрашивают препарат красителем Романовского-Гимза в течение суток, затем ополаскивают слабощелочной водой (рН 7,2), высушивают и микроскопируют с иммерсией. Ядерные вещества окрашиваются в красно-фиолетовый цвет, цитоплазма - в слабо-розовый.

Реакция Фельгена. Препарат обрабатывают фиксатором Карнуа в течение 5 мин., промывают абсолютным спиртом, гидролизуют 7 минут в растворе 1н. соляной кислоты, подогретой до 60°C, погружают на 1-2 минуты в холодную 1н. соляную кислоту и переносят в фуксинсернистую кислоту (реактив Шиффа)

на 3-4 часа. Препараты последовательно промывают в трех кюветах с сернистой водой по 20 минут в каждой, затем споласкивают дистиллированной водой, высушивают и микроскопируют. Ядерное вещество окрашивается в фиолетовый цвет.

Модификация метода Фельгена. После гидролиза в соляной кислоте препарат немедленно промывают водой и помещают на 15 минут в 1%-й раствор формалина. Вновь промывают водой и окрашивают в течение 1-2 минут 0,1-1%-м водным раствором основного фуксина. Препарат промывают, высушивают, исследуют с иммерсией. Цитоплазма окрашивается в розовый цвет, нуклеоид - в ярко-малиновый.

б) Реактивы для выявления нуклеоида.

1. Фиксатор Карнуа: 96%-й этиловый спирт - 60 мл, хлороформ - 30 мл, ледяная уксусная кислота - 10 мл (время фиксации - 15 минут).

2. Краситель Романовского-Гимза: состоит из смеси азура, эозина и метиленового синего. Перед употреблением к 10 мл красителя добавляют 10 мл дистиллированной воды (рН 7,2).

3. 1н. соляная кислота.

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

3. Лабораторное занятие № 3. Морфологические и культуральные признаки бактерий. Простые и сложные методы окраски. Приготовление фиксированного препарата, окраска по Граму и микроскопия бактерий.

Цели занятия: получение умений по изучению культуральных и морфологических признаков бактерий и навыков приготовления мазков по Граму.

Задание: законспектировать определение культуральных и морфологических признаков бактерий, окраску мазка по Граму. Приготовить мазок по Граму, под микроскопом определить грампринадлежность бактерий и их форму, описать полученные результаты в тетради.

План проведения занятия:

1. Изучение культуральных признаков бактерий.
2. Изучение морфологических признаков бактерий.
3. Окраска по Граму и микроскопия бактерий.

Оборудование и материалы: термостат, спиртовки, первичные бактериологические посе́вы 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 вышеописанными 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 1–3 °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: а) степень развития и характер роста (отсутствие, скудный, умеренный, хороший, отдельными колониями, сливной, нитевидный, распространяющийся, корневидный);

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

в) размер колоний (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 колоний (плоский, приподнятый, выпуклый, вогнутый, вдавленный);

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

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

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

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

л) 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:

а) рост по уколу (в виде ленты, нити, гвоздя со шляпкой, равномерный, прерывистый, поверхностный);

- б) разжижение желатина (чашечкой, воронкой, гвоздем, цилиндром, кратером, чулком, послойное, пузырчатое в глубине, поверхностное);
- в) скорость разжижения (быстро, медленно);
- г) 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. Бактерии, способные расти при низкой температуре, оставляют стоять в комнате при 20–22°C. Остальные посевы инкубируют в термостате при 36°C. При температуре 36°C 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;
- 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%-го 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 посевают 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%-й 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°C). 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 Андреде, 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 $(37 \pm 1)^\circ C$ 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 также, 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 ($\text{pH} = 8,1$), 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%-м 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.

4. Лабораторное занятие № 4. Дрожжевые и плесневые грибы: культуральные и морфологические признаки (окраска и микроскопия).

Цели занятия: получение умений по изучению культуральных и морфологических признаков плесневых грибов и дрожжей и навыков работы с ними.

Задание: законспектировать определение культуральных и морфологических признаков плесневых грибов. Посмотреть под микроскопом культуры плесневых грибов и зарисовать грибы и дрожжи в тетрадь.

План проведения занятия:

1. Определение визуально культуральных признаков грибов.
2. Определение под микроскопом морфологических признаков грибов.
3. Идентификация плесневых грибов до рода.
4. Изучение дрожжей

Оборудование и материалы: микроскоп, термостат, спиртовка, микологическая игла, препаровальная игла, пинцет, предметные и покровные стекла, стерильный физиологический раствор, чашки Петри с тест-культурами грибов *Saprolegnia*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*.

Среди микроскопических грибов имеется немало видов, являющихся возбудителями заболеваний человека и животных. Заболевания, вызываемые грибами, называются микозами. Вегетативное тело гриба представлено мицелием, или грибницей, состоящей из сильно разветвленных нитей – гиф. Гифы грибов бывают одноклеточными с большим числом ядер, представляющих собой одну гигантскую клетку, и многоклеточными, или септированными, то есть разделенными перегородками – септами – на отдельные клетки, содержащие от одного до множества ядер. Гифы большинства грибов, паразитирующих у рыб, не разделены внутренними перегородками. Клетка большинства грибов – это часть гифы, она состоит из хорошо выраженной клеточной стенки и цитоплазмы. В цитоплазме располагаются ядра, мембранные структуры (цитоплазматическая мембрана, эндоплазматическая сеть, аппарат Гольджи), рибосомы, лизосомы, лямбдосомы, митохондрии, вакуоли. Размножение грибов происходит вегетативным (отдельными участками мицелия или путем деления многоклеточного таллома), бесполом (образование специализированных структур размножения, в которых формируются споры) и половым путем (слияние специальных клеток с последующим объединением или слиянием ядер).

Грибы – факультативные паразиты и являются, как правило, возбудителями вторичных инфекций. Возникновение заболевания зависит от патогенности и вирулентности гриба, устойчивости макроорганизма и условий внешней среды. Большинство грибов, возбудителей микозов, поражают органы и ткани рыб, сообщающиеся с внешней средой. Возбудители микозов часто обнаруживаются в свежих очагах некроза тканей, экссудате, полости плавательного пузыря рыб. К наиболее изученным микозам рыб относятся сапролегниоз, бранхиомикоз, ихтиофноз. Возбудителями сапролегниоза могут быть грибы из родов *Saprolegnia*, *Achlya*, *Aphanomyces* и другие. Грибы *Branchiomyces sanguinis* выделяют от пораженных бранхиомикозом карпов, а у линей и щук отмечают другой вид гриба – *B. demigrans*. Многие виды рыб поражает гриб *Ichthyophonus hoferi*, вызывая у них ихтиофноз. В настоящее время описаны также грибы *Phoma herbarum*, вызывающие глубокий микоз у форели и других лососевых (ранее заболевание называлось микозом плавательного пузыря). Размягчение оболочки икры лососевых или лопание икры вызывается грибом из класса *Archimycetae*, близким к роду *Rizophidium*.

Микологические исследования при диагностике болезней рыб. При постановке диагноза заболевания необходимо исключить или подтвердить его грибковую природу. Микологические исследования проводят в микробиологической лаборатории. Пробы патологического материала для микологических исследований берут асептически от только что погибших или погибших животных. Если пробы сразу обработать невозможно, то их можно хранить в холодильнике в замороженном виде от 1 до 3 суток. Для предохранения проб от загрязнения бактериями их можно консервировать на срок до 1 суток в растворе антибиотиков (пенициллина или стрептомицина) по 100 ЕД на 1 мл раствора. Подготовка посуды и приготовление питательных сред для проведения микологического исследования основывается на правилах, принятых в микробиологии. Инструменты, посуда, приборы для микологических исследований аналогичны применяемым при бактериологических исследованиях. Методы исследования сходны с методами, принятыми в бактериологии. Патологический материал исследуют микроскопически, выделяют чистую культуру возбудителя, проводят его идентификацию и изучают патогенные свойства (биологическая проба).

Методика микологического посева рыбы. Рыбу извлекают из воды, обездвигивают, осматривают наружные покровы, проводят стерильное вскрытие и отмечают характерные патологоанатомические изменения. При соблюдении правил асептики вырезают пораженные кусочки органов и тканей. Часть отобранного материала помещают на предметное стекло и используют для микроскопии. Другую часть помещают на 20 минут в чашку Петри с раствором антибиотиков (пенициллина, биомицина или стрептомицина по 100 ЕД на 1 мл) или антисептиков (7–10%-й раствор серной кислоты). Обработанный антибиотиками патологический материал измельчают и переносят асептически на поверхность селективных питательных сред в чашках Петри. Для выявления микроскопических грибов используют агар Сабуро или

Чапека. С одного патологического материала делают не менее 5 посевов. Чашки с посевами помещают в термостат при температуре 15–24 °С.

Состав среды Сабуро: глюкоза (декстроза) – 4 г, пептон – 1 г, агар-агар – 1,8 г на 100 мл дистиллированной воды.

Состав среды Чапека: глюкозы – 3 г, натрия азотнокислого – 0,2 г, калия фосфорнокислого одноосновного – 0,1 г, магния сернокислого – 0,05 г калия хлористого – 0,05 г, железа сернокислого – 0,001 г, агар-агара – 2 г на 100 мл дистиллированной воды. Среды стерилизуют автоклавированием при 0,5 атм. 20 мин и разливают в стерильные чашки Петри или пробирки (скошенный агар). При выделении грибов из патологического материала в среды после стерилизации добавляют антибиотики (пенициллин, стрептомицин) в концентрации 100 ЕД на 1 мл. Микроскопический метод исследования часто является основным при диагностике микозов. Для микроскопии патологического материала используют неокрашенные препараты в капле стерильной воды, физиологического раствора, глицерина с 10%-м едким кали или натра (раздавленная капля) и фиксированные препараты (мазки), окрашенные 1%-м водным раствором метиленового синего, лактофуксином (0,1 г кислого фуксина и 100 мл молочной кислоты), по методу Грама и другими методами. При незначительном количестве и слабой контрастности структурных элементов гриба в препаратах из нативного материала микроскопическое исследование бывает затруднительно. Следует учитывать также, что паразитарные (тканевые) формы многих грибов представлены однообразными спорами или мицелием, резко отличающимся от культуральных форм. Поэтому необходимо проводить микроскопию выделенной чистой культуры гриба. Для этого часто используют метод раздавленной капли или микроскопию изучаемой колонии на месте ее роста. Препарат в виде раздавленной капли изготавливают путем переноса части мицелия на предметное стекло в каплю воды или раствора красителя. Каплю накрывают покровным стеклом и исследуют при малом и среднем увеличении микроскопа.

Одним из способов изучения колоний на месте их роста является получение микрокультуры исследуемого гриба на плотной питательной среде. Для этого можно использовать предметное стекло с лункой, наполовину заполненной средой. После посева гриба на среду, лунку закрывают стерильным покровным стеклом. Элементы строения колоний гриба, образующегося в пространстве между покровным стеклом и слоем агара, исследуют при малом и большом увеличении микроскопа.

Полученные чистые культуры описывают по культуральным и морфологическим признакам.

Из культуральных признаков микроскопических грибов учитывают размеры колоний, форму, строение края и центра, поверхность (гладкая, пушистая, рыхлая, бархатистая, войлочная, паутинистая, хлопьевидная, мелкозернистая, крупнобугристая и т. д.), консистенцию (плотная, хрупкая,

слизистая, порошковидная и т. д.), цвет колоний, пигментацию среды и обратной стороны колоний.

Из морфологических признаков учитывают своеобразие ветвления мицелия, размеры и форму конидиеносцев, направление роста и отношение к главной (материнской) гифе, степень ветвления воздушного мицелия (нити 1–3-го порядков), длину и ширину клеток мицелия, характер спорообразования. Все характерные признаки используют для определения семейства, рода, вида гриба с помощью Определителей.

Постановка биологической пробы. В том случае, если выделенный гриб является возбудителем микоза рыб, то проводят биологическую пробу для определения его патогенности. Выбор подопытных рыб при этом должен соответствовать виду и возрасту больных рыб, от которых выделена культура гриба. Методика постановки биопробы аналогична принятой в бактериологии. Для заражения можно использовать как патологический материал, так и чистые агаровые культуры микроскопических грибов. Патологический материал (пораженные органы и ткани) используют в виде суспензии на физиологическом растворе, обработанной антибиотиками для избегания бактериального загрязнения. Обработку антибиотиками проводят так же, как при микологическом посеве.

Суспензии грибов с чистых, агаровых 48–72-часовых культур получают смыванием спор и мицелия физиологическим раствором. Смывы затем центрифугируют, надосадочную жидкость сливают, а осадок разводят до 1 мл физиологическим раствором. Подсчитывают количество клеток гриба в камере Горяева, затем разводят до получения суспензии с нужным количеством клеток в 1 мл физиологического раствора (от 250 тыс. до 1–2 млн в 1 мл). Для определения патогенности и вирулентности гриба рыб заражают рядом возрастающих доз методами аналогичными, как в бактериологии. Биопроба считается положительной, если рыба заболела и отмечается ее гибель (50 % рыб) с характерными клиническими (изменение поведения и наружных покровов) и патологоанатомическими (абсцессы, гранулемы в органах и тканях) признаками, и если при микроскопическом выделении чистой культуры и гистологическом исследовании патологического материала обнаружены микроскопические грибы в организме рыбы.

Плесени входят в большую группу растительных форм, объединенных в ботанике под названием грибов. Плесневые грибки очень часто образуют на мороженой, малосоленой, сушеной, копченой, вяленой рыбе и на икре обширные разрастания.

Развитие плесневых грибков вызывает в рыбных продуктах глубокие изменения: уменьшается содержание экстрактивных и питательных веществ, выделяется аммиак, образуются летучие кислоты, происходит расщепление белковых и жировых веществ. В результате этих изменений продукты могут стать негодными. В силу этого плесневые грибки могут причинить большие убытки, поэтому борьба с плесенями в рыбной промышленности играет не менее важную роль, чем борьба с гнилостными бактериями.

Вегетативное тело плесневых грибов представляет собой войлокообразное сплетение тонких нитей (гифов), называемых грибницей или мицелием. Плесневые грибки размножаются спорами и конидиями или частицей мицелия, дающими при прорастании начало новому мицелию. Мицелий может быть одноклеточным, т.е. лишенным внутренних перегородок, или многоклеточным, делящимся перегородками на ряд клеток.

При достижении определенного возраста из стелющегося мицелия поднимаются плодоносящие гифы (спорангиеносцы или конидиеносцы), несущие плодовые тела (споры). Споры образуются в особых вместилищах – спорангиях (эндогенно) и на особых гифах (экзогенно). В последнем случае споры называются конидиями. Конидии образуются на конидиеносцах поодиночке или группами из нескольких конидий, или цепочками, прикрепленными к особым вытянутым клеткам, так называемым стеригмам. Конидии бывают желтые, розовые, бурые, зеленые или совсем бесцветные в зависимости от вида плесени. По строению конидии могут быть одноклеточными или многоклеточными; последние получают у многих грибов в результате вторичного образования внутренних перегородок.

Спорангии образуются на верхушках спорангиеносцев в виде шариков, наполненных обычно одноклеточными спорами. При созревании спорангий лопаются и выбрасывают споры, а созревшие конидии осыпаются и при благоприятных условиях прорастают.

Оптимальная температура для развития плесневых грибов лежит в пределах 25-35°C; медленно они растут и при более низких температурах. Развиваются преимущественно там, где условия препятствуют развитию бактерий.

Из плесневых грибов, часто встречающихся на пищевых рыбных продуктах, необходимо отметить следующие.

Мукоровые плесени (род *Mucor*) широко распространены в почве и на различных пищевых продуктах. Для мукоровых грибов характерным является одноклеточность воздушного мицелия, от которого обособляются одиночные – простые или светящиеся спорангиеносцы с шарообразными спорангиями (наверху). Внутри спорангиев сначала образуются вакуоли, которые собираются в кучки и разделяют протоплазму на ряд отдельных клеток-спор. Споры бывают буроватого, сероватого или желтоватого цвета в зависимости от вида плесени.

Мукоровые плесени имеют некоторое сходство с дрожжами. Погруженные в питательную среду гифы делятся перегородками, а затем распадаются на ряд округлых клеток (мукоровые дрожжи), способных размножаться почкованием. При нормальных условиях аэрации из мукоровых дрожжей вырастает снова плесневый мицелий. Кроме того, размножение мукоровых грибов происходит путем прорастания спор или частиц мицелия. Иногда размножение протекает и половым путем. При этом на лежащих близко друг от друга гифах появляются раздутые отростки, отделенные от основных гиф перегородками; отростки эти соприкасаются, оболочки в месте

соприкосновения растворяются и содержимое сливается в одном общем канале; в центре этого канала образуется зигоспора, имеющая округлую форму с удвоенной оболочкой. Настоящий половой процесс встречается только у грибов, обладающих одноклеточным мицелием, что является характерным для муковых плесеней.

Аспергилловые плесени (род *Aspergillus*) имеют многоклеточный мицелий, на котором развиваются неветвящиеся конидиеносцы. На верху последних образуются вздутые головки-колонки различной формы, несущие на себе радиально расходящиеся продолговатые отростки, так называемые стеригмы. На стеригмах образуются цепочки конидий различной формы (круглые, грушевидные, эллипсоидальные, гладкие или бородавчатые), окрашенные в зеленый, бурый, желтый, черный и другие цвета в зависимости от вида плесени.

Виды этих грибов различаются между собой цветом дерновинок и строением конидиеносцев, формой их колонок, строением стеригм, формой и размером конидий. *Aspergillus* широко распространен в почве и на различных пищевых продуктах.

Кистевидные плесени (род *Penicillium*). Эти многоклеточные грибки характеризуются тем, что их конидиеносцы разветвляются наверху, дают 2-4 толстых коротких побега, из которых вырастают стеригмы. От стеригм отшнуровываются конидии в виде цепочек. Конидии бывают гладкие, округлые, бесцветные или окрашенные в зеленоватый, сизый, иногда песочный цвета в зависимости от вида плесени. При исследовании надо обращать внимание на форму разветвления конидиеносцев и форму самих конидий, а также на окраску грибка.

Кистевидные плесени, как и аспергилловые, часто поражают самые разнообразные пищевые продукты.

Грибки рода *Fusarium* характеризуются наличием серповидных светло окрашенных одно- и многоклеточных конидий (микро- и макроконидий). Грибница окрашена в желтый, розоватый, фиолетовый или другие цвета в зависимости от вида грибка. Конидии располагаются на мицелии или могут быть собранными в подушечки-спородохии. Некоторые виды этого рода образуют хламидоспоры.

Различные виды этого грибка встречаются в муке, хлебных дрожжах, солоде, масле, плодах, овощах. Гораздо реже подобные грибки можно встретить на рыбных продуктах.

Некоторые плесени утратили способность образовывать споры, хотя и сохранили мицелий и размножаются почкованием. К таким плесеням относятся различные виды рода *Oidium*, у которых мицелий распадается на отдельные клетки, а также род *Monilia*, образующий свободные клетки путем почкования мицелия. Эти плесени являются переходными формами от плесеней к дрожжам.

При исследовании плесеней, выделенных из пищевых рыбных продуктов, практически ограничиваются установлением лишь их рода.

Изучение плесеней начинается с посева исследуемого материала на питательные среды и получения чистых культур. Для посева удобно пользоваться согнутыми под прямым углом металлическими иглами, которые впаяны в стеклянные палочки, или скальпелем.

Материал для исследования снимают скальпелем с поверхности исследуемого продукта в виде небольшой выемки и стерильно переносят в пробирку с расплавленным и охлажденным до 40-45 °С суловым агаром, взбалтывают и выливают в чашки Петри.

При исследовании жидкости, если на ее поверхности отсутствует плесень для посева, берут обычным методом 0,5-1 мл ее и переносят на суловый агар в чашках Петри.

Выращивание плесеней производят при комнатной температуре (15-20°C) до 9 суток при ежедневном наблюдении за состоянием посевов. При обнаружении роста производят отсев чистой культуры на косой суловый агар. Во избежание вторичной отвивки одной и той же культуры, необходимо место, откуда был взят мазок, обвести цветной тушью по стеклу с наружной стороны дна чашки.

С санитарно-гигиенической точки зрения необходимо установить не только видовой состав плесени в пищевых продуктах, но и определить и степень обсеменения продуктов грибками.

Определение подсчета грибков производят с помощью камер Говарда, Тома-Цейса, или другой счетной камеры. Лучше всего использовать камеру Говарда. Для этого часть исследуемого продукта тщательно перемешивают (при необходимости делают разведение в 2-3 раза водой), каплю наносят в центр камеры и накрывают покровным стеклом. Капля должна быть такой величины, чтобы она равномерно распределилась на стекле и не попала в желобок камеры.

Счет грибков ведут под микроскопом при малом увеличении – около 90 раз при диаметре поля зрения около 1,38 мм не менее, чем в двух препаратах. В каждом препарате просматривают по 25 полей зрения и одновременно ведут учет тех полей, в которых встречаются гифы грибков. Берут во внимание те поля, в которых будет обнаружена хотя бы одна гифа длиной не менее $\frac{1}{6}$ части диаметра поля зрения.

Количество полей, в которых обнаружены гифы плесени, делят на число всех просмотренных полей зрения, умножают на 100 и таким образом получают процент полей зрения с плесневыми грибками.

Количественный учет плесеней в пищевых продуктах можно производить и методом культивирования (в чашках Петри).

Дрожжи – одноклеточные, лишённые хлорофилла растительные немиецелиальные грибы, относящиеся к классу аскомицетов (сумчатые грибы). Существует большое количество видов дрожжей. Формы дрожжей весьма разнообразные - яйцевидная, эллиптическая, цилиндрическая, лимонovidная и шаровидная. Размер дрожжевых клеток больше, чем бактериальных, и достигает в диаметре 8-10 мкм. Дрожжевые клетки неподвижны и имеют

клеточную стенку, цитоплазму и ясно выраженное дифференцированное ядро. У зрелых дрожжей обнаруживаются 1-2 вакуоли различной формы. В цитоплазме имеются разные включения: гликоген, волютин, капли жира. В некоторых дрожжевых клетках может накапливаться до 30-50% жира.

Размножение дрожжей происходит главным образом почкованием, реже спорообразованием и еще реже простым делением. При почковании у зрелой клетки на поверхности клеточной стенки появляется выпячивание – почка, которая постепенно увеличивается. В это выпячивание из материнской клетки переходит часть цитоплазмы и ядра, после чего почка отшнуровывается от материнской клетки и начинает самостоятельное существование. Иногда дочерние клетки не отрываются от материнской, в результате чего образуются большие дрожжевые колонии. При спорообразовании в дрожжевой клетке образуется 2-4, а иногда 8-12 спор. Дрожжевая клетка в этом случае рассматривается как аскус (сумка), а споры – как аскоспоры.

Некоторые виды дрожжей размножаются, как и бактерии, простым делением. Деление у них происходит путем образования одной или нескольких поперечных перегородок.

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

5. Лабораторное занятие № 5, 6. Санитарно-бактериологические исследования объектов внешней среды (водопроводной воды и воздуха). Учет результатов посевов водопроводной воды и воздуха. Оформление протоколов исследования

Цели занятия: получение умений по санитарно – бактериологическому исследованию водопроводной воды и воздуха и навыков посева воды и воздуха, анализу результатов и составлению протоколов исследования.

Задание: законспектировать анализ проведения санитарно – бактериологического посева воды и воздуха. Проанализировать полученные результаты и составить протокол исследования.

План проведения занятия:

1. Изучение методов посева воды и воздуха.
2. Посев воды методом мембранной фильтрации.
3. Посев воздуха методом Коха.
4. Учет результатов посева и оформление протоколов.

Оборудование и материалы: чашки Петри с агаром, чашки Петри с Эндо, фильтрационная установка, спиртовки, мерные цилиндры, фильтры бумажные, термостаты бактериологические петли.

Санитарно–бактериологическое исследование водопроводной воды.

Метод мембранной фильтрации является одним из способов определения количественных и качественных характеристик микроорганизмов, находящихся в объектах микробиологического исследования. Принцип метода заключается в пропускании анализируемой пробы через фильтр, на поверхности которого остаются все присутствующие микроорганизмы. После фильтрации, микробы помещают в инкубатор на питательную среду и наблюдают за их жизнедеятельностью.

Метод мембранной фильтрации имеет ряд преимуществ: возможность определить число микроорганизмов; результаты, полученные методом мембранной фильтрации, обладают высокой точностью; есть возможность исследовать и проанализировать объекты с малым количеством микроорганизмов, находящихся в них; на результаты исследования не оказывают влияние замедлители роста микроорганизмов; нет излишней траты питательных сред; краткосрочность выполнения исследования; возможность задокументировать результат.

Анализ образцов путем мембранной фильтрации включает несколько этапов:

- Забор пробного материала;
- Фильтрация;
- Посев и культивирование;
- Инкубирование;
- Анализ.

Забор пробного материала

Отбор материала для анализа должен проводиться в соответствии со следующими требованиями:

Асептические условия с использованием стерильных инструментов;

Объем и масса пробного материала должны соответствовать нормам, указанным для каждого вида микроорганизма;

Отобранная субстанция должна быть проанализирована немедленно или после хранения в холодильной камере не более суток.

Самым важным этапом микробиологического исследования является фильтрация пробного материала. Для успешного проведения процедуры необходим фильтр из правильно подобранного материала. Как показали многолетние исследования, оптимальным вариантом для роста микроорганизмов является фильтр из эфиров целлюлозы. Размер пор подбирается индивидуально для каждого вида микроорганизмов, при этом оптимальной величиной считается 0.45 мкм.

Посев и культивирование представляют собой процессы размещения и выращивания отфильтрованных микроорганизмов на специальных питательных

средах. Если культивирование происходит с соблюдением определенных температурных режимов, то этот процесс называется инкубированием.

Выращивание различных культур микроорганизмов проходит следующие этапы:

Подбор необходимой питательной среды;

Посев микроорганизмов на специальную питательную среду для культивирования;

Создание и поддержание необходимых для выращивания микроорганизмов условий;

Получение и выборка готовой посевной культуры.

Этап анализа заключается в подсчете выращенных колоний микроорганизмов. Предварительное их количество определяют через 2 – 3 дня, а итоговое – через 5 дней. При обнаружении роста определенных микроорганизмов, делают вывод о том, что исследуемый объект не обладает противомикробными свойствами.

Оборудование, необходимое для выполнения мембранной фильтрации

Для микробиологических исследований путем мембранной фильтрации применяют вакуумные системы фильтрации из разных материалов, которые бывают:

- моносекционные (для исследования одной пробы);
- многосекционные – 3-6 секций (для исследования нескольких проб одновременно).

Фильтродержатели

Важным компонентом систем фильтрации являются фильтродержатели, которые в зависимости от типа материала, имеют следующие разновидности:

- пластиковые;
- из нержавеющей стали;
- стеклянные;
- поликарбонатные.

Микрофлора воздуха характеризуется непостоянством, т.к. представлена микроорганизмами, обитающими в почве и воде. Воздух, обсемененный крупными бактериальными каплями, представляет собой малоустойчивую систему. Длительность нахождения в воздухе микробов и дистанция их распространения в этой фазе невелики. Речменский С.С. установил многофазный характер бактериальных капель:

1. Крупнокапельная, или крупноядерная фаза (частицы диаметром > 100 мкм);
2. Мелкокапельная, или мелкоядерная фаза (частицы диаметром от 1 до 5 мкм);
3. Пылевая фаза (диаметр зависит от размера пылевых частиц, с которыми соединяются микроорганизмы; как правило, размеры частиц пыли находятся в пределах от 1 до 100 мкм).

Мелкие бактериальные капли имеют ничтожный вес, что способствует их длительному нахождению в воздухе и рассеиванию на большие расстояния. Скорость их движения измеряется величиной 0,3 мм в секунду. Мелкокапельная фаза имеет большое эпидемиологическое значение – с мелкими каплями по воздуху рассеиваются различные микроорганизмы, даже чувствительные к внешним воздействиям микробы и вирусы - палочки коклюша, инфлюэнцы, менингококка, кори и т.д.

Быстрота движения в воздухе бактериальной пыли определяется интенсивность воздушных вихрей и может колебаться от 0,3 м/мин до 0,3 м/с. Роль бактериальной пыли состоит в распространении с воздушными течениями тех видов микроорганизмов, которые при высыхании не теряют жизнеспособности (возбудитель туберкулеза, споровые формы).

В последнее время все острее встает проблема микробиологического загрязнения воздуха, причиной которого является деятельность человека. Особое внимание привлекает загрязнение воздуха предприятиями микробиологической промышленности, где необходимая продукция получается путем использования жизнедеятельности разнообразных микроорганизмов. Однако из-за недостаточной герметичности процессов имеет место поступление жизнеспособных микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности в воздух производственных помещений. В воздухе крупных животноводческих комплексов и птицефабрик в 1 м³ воздуха содержание бактерий колеблется от сотен тысяч до нескольких миллионов. Процессы, развивающиеся при гниении сена и при силосовании, сопровождаются обильным размножением плесневых грибов и термофильных актиномицетов. В основном в атмосферном воздухе встречается три группы организмов:

- 1) патогенные формы;
- 2) почвенные спороносные аммонифицирующие и гнилостные микроорганизмы;
- 3) плесневые грибы и дрожжи.

Микробиологические нормативы оценки состояния воздуха

Бактериальная обсемененность воздуха жилых помещений во много раз превышает обсемененность наружного воздуха. Микрофлора воздуха закрытых помещений отличается по своему характеру. Здесь в большом количестве содержатся микробы - нормальные обитатели носоглотки человека, а также патогенные микробы, попадающие из полости рта при кашле, чихании, разговоре, смехе. Вторым источником воздушной патогенной флоры служат открытые очаги поражений на любых участках тела. Большие скопления людей и длительность пребывания их в плохо вентилируемых помещениях способствуют максимальному загрязнению воздуха патогенной флорой.

Еще большую опасность представляет воздух инфекционных и хирургических больниц, изобилующих патогенной флорой. Через воздух передаются **гнойные кокки (стафилококки, стрептококки, пневмококки, менингококки), возбудители туберкулеза, дифтерии, сибирской язвы, коклюша, чумы, сапа, патогенные грибки, разнообразные вирусы (гриппа,**

кори, эпидемического паротита, ветряной оспы, пситтакоза, энцефалита) и др.

В этой связи при оценке санитарного состояния воздуха различных закрытых помещений очень часто приходится прибегать не только определению санитарно-показательных микроорганизмов, но и к непосредственному выделению патогенных вирусов и бактерий. Особенно большое значение это имеет при расшифровке вспышек респираторных инфекций в детских учреждениях и в стационарах лечебно-профилактических учреждений.

Аэрогенные инфекции представляют большую опасность – они распространяются чрезвычайно быстро, поражая большие контингенты людей на обширных территориях. Методы исследования воздуха и подхода к его санитарно-гигиенической оценке по бактериологическим показателям были разработаны в результате длительных исследований. Особенно оживленная дискуссия велась при установлении санитарно-показательных микроорганизмов для воздуха. Все исследователи сходились на том, что эта роль должна принадлежать микробам – постоянным обитателям носоглотки человека, причем тем из них, которые хорошо растут на искусственных питательных средах и сравнительно легко обнаруживаются. В качестве главного санитарного показателя одни исследователи (Шафир, Гордон) предлагали показатель содержания зеленеющих стрептококков (α -стрептококки), другие отдавали предпочтение β -гемолитическим стрептококкам (Речменский, Шнайтер, Данн). В результате эта роль была признана за зеленеющими α -стрептококками, β -гемолитическими стрептококками и *St. aureus* (золотистый стафилококк) с учетом их различной эпидемиологической значимости.

В настоящее время при исследовании воздуха определяются:

I) общая обсемененность (количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха)

II) наличие и степень обсемененности воздуха санитарно-показательными микроорганизмами (α -, β - стрептококки и *St. aureus*).

Для жилых, общественных помещений и больниц можно рекомендовать следующие ориентировочные данные по общей обсемененности воздуха (таб. № 1, 2, 3).

Таблица 1. Санитарно-микробиологические показатели воздуха (Лерина И.В. и Педенко А.К., 1980)

Степень чистоты воздуха	КОЕ в 1 м ³	Гемолитический стрептококк
Чистый	До 2000	До 10
Удовлетворительный	2000-4000	11-40
Слабо загрязненный	4000-7000	40-110
Сильно загрязненный	Более 7000	Более 120

Таблица 2. Критерии оценки воздуха жилых помещений

Оценка воздуха	Общее количество бактерий в 1 м ³	Количество стрептококков
Лето Чистый Загрязненный	до 1500 до 2500	до 16 до 36
Зима Чистый Загрязненный	до 4500 до 7000	до 36 до 124

Таблица 3. Критерии оценки микробной обсемененности воздуха в родильных домах

Место отбора	Условия работы	Общее количество колоний в 1 м ³ воздуха	Количество St. aureus в 1 м ³ воздуха
Операционные, родильные залы	До начала работы	Не выше 500	Не должно быть
	Во время работы	Не более 1000	Не более 10
Палаты для недоношенных и травмированных детей	При подготовке к приему детей	Не более 300	Не должно быть

Санитарно-микробиологическое исследование воздуха

Микробиологическое исследование атмосферного воздуха, а также воздуха жилых помещений, занимает важное место при осуществлении его очистки от бактериального загрязнения, как мера борьбы с аэрогенными инфекциями.

Объектами санитарно-бактериологического исследования являются: воздух лечебно-профилактических и детских учреждений, мест массового скопления людей, промышленных районов. Санитарно-микробиологическое исследование воздуха закрытых помещений, так и любого объекта внешней среды, включает, четыре основных этапа:

- 1) отбор проб воздуха
- 2) обработку проб и концентрирование возбудителей
- 3) выделение микроорганизмов
- 4) идентификация выделенных микроорганизмов

Исследование воздуха включает определение общего числа сапрофитных бактерий, стафилококков, стрептококков, которые являются показателями биологической контаминации воздуха микрофлорой носоглотки человека. Методы отбора проб воздуха можно разделить на седиментационные и аспирационные.

Седиментационный метод. Основан на оседании бактериальных частиц и капель под влиянием силы тяжести на поверхности агара открытых чашек Петри. Их устанавливают в точках отбора на горизонтальной поверхности. Для определения общей микробной обсемененности воздуха чашки Петри с МПА

оставляют открытыми на 5-10-15 мин в зависимости от предполагаемого бактериального загрязнения. Инкубацию посевов проводят при 37° 24 ч, затем чашки Петри оставляют при комнатной температуре на 48 ч для образования пигмента пигментообразующими бактериями.

Для определения микробного числа подсчитывают колонии выросшие на чашках Петри (площадь поверхности агара в чашке равна 75 см²) и расчет ведут по правилу В.Л. Омелянского: на поверхность площадью 100 см² за 5 мин оседает такое количество микробов, которое содержится в 10 л воздуха:

$$X = \frac{A \times 100 \times 100}{75 \text{ см}^2}$$

X – количество микробов в 1 м³; A – количество колоний на агаре в чашке Петри.

Аспирационный метод. Основан на принудительном оседании микроорганизмов на поверхность плотной питательной среды или в улавливающую жидкость. Для этой цели используются аппарат Кротова, бактериоуловитель Речменского, прибор ПОВ-1 и др.

Определение стафилококков

Обнаружение патогенных стафилококков в воздухе закрытых помещений имеет санитарно-показательное значение и свидетельствует об эпидемическом неблагополучии (табл. № 3). Отбор проб проводят с помощью аппарата Кротова в количестве 250 л воздуха на 2 чашки Петри с молочно-солевым агаром и на чашку с кровавым агаром. Посевы инкубируют при 37°С 48 ч. Из подозрительных на стафилококк колоний выделяют чистую культуру на скошенном агаре. После 24 ч инкубации при 37°С проверяют плазмокоагулирующую активность культуры.

Определение стрептококков

Отбор проб воздуха при исследовании на наличие α- и β- гемолитических стрептококков проводят аппаратом Кротова на чашках Петри с кровавым агаром. Исследуют 250 л воздуха. Посевы выдерживают в термостате 24 ч, а затем еще 48 ч при комнатной температуре. Подсчет количества выросших колоний проводят на 1 м³ с последующим контрольным микроскопированием и выборочным пересевом колоний на кровавой агар или сахарный бульон.

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

6. Лабораторное занятие № 7, 8. Биохимические процессы, вызываемые микроорганизмами: спиртовое, молочнокислое, маслянокислое брожение. Аммонификация белков. Анализ результатов спиртового, молочнокислого, маслянокислого брожения и аммонификации белков. Исследование микрофлоры свежего и испорченного мяса методом препаратов-отпечатков.

Цели занятия: получение умений по определению качества молока и мяса и навыков определения кислотности молока, определения качества мяса по мазкам-отпечаткам, анализу результатов по составлению протоколов исследований.

Задание: законспектировать определение кислотности молока методом титрования и качества мяса методом препаратов отпечатков. Проанализировать результаты, сделать выводы и записать их в тетрадь.

План проведения занятия:

1. Определение кислотности молока методом титрования.
2. Определение качества мяса методом препаратов отпечатков.
3. Рассмотрение под микроскопом молочнокислых бактерий

Оборудование и материалы: молоко, мясо, пробирки, чашки Петри, питательные среды, бактериологические петли, центрифуга, ступки, водяная баня, фильтры, спиртовки, весы, термостаты, колбы, плитки пипетки, едкий натр, фенолфталиин, стерильные стекла, пинцеты, микроскопы.

Определение кислотности молока (ГОСТ 3624 – 92)

По кислотности молока судят о его свежести. Кислотность необходимо знать для установления сорта молока, а также для определения возможности пастеризации и переработки молока на молочные продукты. Кислотность можно определять с помощью прибора pH-метра (активную кислотность). Активная кислотность молока находится в пределах 6,5 – 6,7. Обычно же определяют титруемую кислотность в условных градусах или градусах Тернера (° Т).

Под градусом Тернера подразумевается количество миллилитров 0,1 н. раствора щелочи, пошедшей на нейтрализацию (титрование) 100 мл молока, разбавленного вдвое дистиллированной водой, при индикаторе фенолфталеине.

Титруемая кислотность свежего молока находится в пределах 16 – 18 оТ и обуславливается:

- 1) кислотным характером белков (5-6 оТ);

- 2) фосфорнокислыми, лимоннокислыми солями и лимонной кислотой (10-11 оТ);
- 3) растворенной углекислотой (1-2 оТ).

Метод титрования.

Метод основан на нейтрализации кислот, содержащихся в продукте, раствором щелочи (NaOH, KOH) в присутствии индикатора фенолфталеина.

Техника определения. В колбу мерной пипеткой отмеряют 10 мл молока, добавляют 20 мл дистиллированной воды и 2-3 капли 1%-го спиртового раствора фенолфталеина. Воду при определении прибавляют для того, чтобы отчетливее уловить розовый оттенок при титровании. Затем при медленном взбалтывании содержимого колбы приливают из бюретки децинормальный (0,1н.) раствор щелочи (едкий натр) до слабо-розового окрашивания, соответствующего контрольному эталону окраски, не исчезающего в течение 1 минуты. Количество пошедшей на титрование щелочи (отмеряют по уровню нижнего мениска), умноженное на 10 (то есть пересчитанное на 100 мл молока), будет выражать кислотность молока в градусах Тернера. Расхождение между параллельными определениями должно быть не более 1 оТ. Если нет дистиллированной воды, кислотность молока можно определить и без нее. В этом случае результаты отсчета надо уменьшить на 2 о Т.

Предельная кислотность молока. Метод определения предельной кислотности позволяет провести сортировку при массовой приемке молока на кондиционное (до 19 – 20 оТ) и не кондиционное (свыше 20 оТ). Метод основан на нейтрализации кислот, содержащихся в продукте, избыточным количеством щелочи (NaOH, KOH) в присутствии индикатора фенолфталеина. При этом избыток щелочи и интенсивность окраски в полученной смеси обратно пропорциональны кислотности молока.

Техника определения. Для приготовления рабочего раствора щелочи в мерную колбу на 1 л отмеривают нужное количество (табл. 1) 0,1 н. раствора щелочи (NaOH), 10 мл 1%-го раствора фенолфталеина и добавляют дистиллированной воды до метки.

Таблица 1. Определение предельной кислотности молока

Количество 0,1 н. раствора едкого натра (калия), мл	
Кислотность, °Т	

В ряд пробирок наливают по 10 мл едкого натра (калия), приготовленного для определения соответствующего градуса кислотности. В каждую пробирку с раствором приливают по 5 мл испытуемого молока и содержимое пробирки перемешивают путем перевертывания. Если содержимое пробирки обесцветится, кислотность выше показателя, соответствующего данному раствору.

Затем из глубины подготовленной таким образом пробы стерильно вырезают небольшой кусочек мяса (величиной с зерно фасоли) и срезанной стороной прикладывают к поверхности предметного стекла, оставляя на нем отпечаток (клятч-препарат).

Отпечаток высушивают и фиксируют на пламени. После фиксирования отпечаток окрашивают по Граму. Приготовление мазков и клятч-препаратов. Стерильно взятый кусочек или соскоб пораженного органа (ткани) помещают на предметное стекло ближе к узкому краю, накрывают другим предметным стеклом, стекла прижимают друг к другу, разводят в противоположные стороны и получают мазки с равномерно распределившимся материалом. Для изучения взаимного расположения структурных элементов пораженного органа (ткани) и патогенных микроорганизмов делают мазки-отпечатки (клятч-препараты). Вырезают из органа небольшой кусочек, прикладывают поверхностью среза к предметному стеклу несколько раз, получая ряд мазков-отпечатков. Высушенные на воздухе или над пламенем спиртовки мазки и клятч-препараты фиксируют 96°-м спиртом 10 минут и окрашивают по методу Грама. На мазки через фильтровальную бумагу наносят раствор генцианвиолета на 2 минуты. Затем бумагу снимают и на стекло наносят раствор Люголя. Краску выдерживают в течение 2 минут. После этого на мазки наносят 96%-й спирт на 30 секунд, который смывают водой. Мазки докрашивают раствором фуксина Пфейффера 2 минуты, промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионным маслом.

Данные для оценки:

1. Мясо свежее. На отпечатках микроорганизмов нет или имеются единичные кокки или палочки. На стекле совершенно незаметно разложившейся ткани.

2. Мясо подозрительной свежести. В поле зрения отпечатка до 20—30 кокков и палочек. На стекле ясно заметны распавшиеся мышцы.

3. Мясо несвежее. В поле зрения свыше 30 микроорганизмов с преобладанием палочек. На стекле большое количество распавшейся ткани мышц.

Для проведения последующих реакций готовят мясной экстракт. 10 г исследуемого мяса, очищенного от жира, костей и сухожилий, мелко размельчают ножницами и помещают в колбу емкостью в 250 мл. В колбу наливают 100 мл дистиллированной воды и энергично встряхивают. После 15-минутного настаивания с периодическим встряхиванием экстракт фильтруют через бумажный фильтр. Фильтрат служит исходным материалом для всех последующих проб, кроме пробы на сероводород.

7. Лабораторное занятие № 9, 10, 11. Анализ результатов санитарно-микробиологического исследования кормов для животных. Выделение доминирующих типов колоний бактерий и пересев на дифференциально-диагностические среды. Идентификация выделенных культур бактерий. Определение доминирующего микробного фона кормов. Оформление протокола исследования.

Цели занятия: получение умений по санитарно-микробиологическим исследованиям кормов для животных и навыков по определению обсемененности бактериями и плесневыми грибами кормов для животных, анализу результатов и по составлению протоколов исследования.

Задание: законспектировать схему санитарно-микробиологического исследования кормов для животных. Выполнить посев корма. Определить обсемененность бактериями и плесневыми грибами кормов. Проанализировать полученные результаты. Составить протокол исследования корма.

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

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%-й 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 Клиглера, 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* А 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 среду 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%-м полужидком МПА.

Для определения культурально-биохимических свойств бактерий используют набор питательных сред, куда входят среды с углеводами и индикатором Андреде (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 ботулиним, 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°C 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 °С.

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

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 °С.

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 °С.

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 °С.

Результаты теста гидролиза эскулина грамположительными бактериями.

ВЫВОДЫ:

1. Какова общая характеристика микробной обсемененности кормов?
2. Какие виды микроорганизмов доминируют в данной пробе?

Локальный электронный методический материал

Елена Витальевна Авдеева

МИКРОБИОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ

Редактор И. Голубева

Уч.-изд. л. 3,7. Печ. л. 3,8.

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