

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования
«Иркутский государственный аграрный университет имени А.А. Ежевского»

Карпова Е.А.

Учебно-методическое пособие
для выполнения
лабораторно – практических занятий по
микробиологии
для студентов направления «Ветеринарно-санитарная экспертиза»

Иркутск – 2018

УДК 579.67(075.8)

ББК 28.4я73

К 265

Рецензенты:

К.б.н. Плискин А.А.

К.с.-х.н. Козуб Ю.А.

Микробиология: учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ для студентов направления подготовки 36.03.01 «Ветеринарно-санитарная экспертиза» / Сост.: Е.А.Карпова // ФГБУ ВО «Иркутский ГАУ им. А.А.Ежевского». – Иркутск, 2018. – 105 с.

Методические указания по выполнению лабораторных работ составлен в соответствии с рабочей программой дисциплины и предназначен для студентов по направлению подготовки 35.03.01 «Ветеринарно-санитарная экспертиза»; содержат описание методов работы в лаборатории с микроорганизмами, детальное изучение их морфологических, биохимических, культуральных, физиологических и тинкториальных свойств. Направлены на формирование у студентов навыков проведения микробиологического исследования патологического материала, а также продуктов производства сельского хозяйства. Материалы ориентированы на вопросы профессиональной компетенции будущих бакалавров ветеринарно-санитарной экспертизы.

Рекомендовано к изданию НМС. Выписка из протокола №1 от 27 ноября 2017 г.

УДК 579.67(075.8)

ББК 28.4я73

Карпова Е.А.
ФГОУ ВПО «Иркутский ГАУ им. А.А. Ежевского», 2018

Лабораторно – практические занятия по микробиологии для студентов направления «ветеринарно-санитарная экспертиза»

Практические занятия дают возможность студентам приобрести навыки работы в микробиологической лаборатории, разработать и более детально изучить некоторые вопросы теоретического курса.

Объекты изучения – микроорганизмы – невидимы невооруженным глазом, поэтому студенты могут ознакомиться с ними только с помощью микроскопа. Это отличает работу в лаборатории по микробиологии от некоторых других биологических дисциплин. В процессе изучения у студентов складываются определенные представления о микроорганизмах, о их роли в природе и в той отрасли, где предстоит работать будущему специалисту. Овладение микробиологическими навыками, знакомство со строением, культуральными, биохимическими и другими свойствами микробов помогут ветеринарному врачу, ветеринарно-санитарному эксперту, технологу, зоотехнику правильно, осмысленно подойти к использованию многих положительных свойств этих существ на практике.

Введение

Основными источниками распространения возбудителей большинства инфекционных болезней, поражающих человека, являются сами люди, а также теплокровные животные. Наиболее массивное выделение ими микроорганизмов в окружающую среду происходит воздушно-капельным и фекальным путями.

Санитарно-микробиологическое исследование объектов окружающей среды обязано решить вопрос о наличии или отсутствии в них опасных для человека микроорганизмов. Непосредственное обнаружение возбудителя инфекционных болезней в объектах окружающей среды (несмотря на то, что в настоящее время разработаны методы прямого, ускоренного и количественного их определения) имеет целый ряд трудностей.

Во-первых, патогенные микроорганизмы находятся в окружающей среде постоянно. Сравнительно легко их можно обнаружить в период эпидемий, но очень трудно в межэпидемические периоды. Основная же деятельность санитарных микробиологов направлена на предупреждение

возникновения эпидемий, и поэтому вся работа ведется в межэпидемические периоды.

Во-вторых, количество патогенных микроорганизмов, попавших в окружающую среду, значительно уступает непатогенным и распространение их в загрязненных объектах неравномерно. Трудности возникают и при выделении патогенных микробов при посевах на питательные среды, даже ингибиторные, поскольку неизбежно страдают от конкуренции сапрофитной микрофлоры. Отрицательные результаты индикации патогенных микроорганизмов в объектах окружающей среды еще не говорят с достоверностью об их отсутствии. Поэтому приходится оценивать различные объекты косвенным путем, устанавливая факт загрязнения их выделениями человека или теплокровных животных. И чем обильнее это загрязнение, тем более вероятно попадание в объект патогенных микробов.

Сообщающие с внешним миром полости тела людей и животных обильно заселены нормальной микрофлорой довольно постоянной по качественному составу и сравнительно мало изменяющейся при инфекционных заболеваниях.

Для многих видов микроорганизмов (обитателей тела здорового организма) полость рта или кишечник являются **биотопами** – единственной средой обитания. Поэтому обнаружение таких микробов вне организма свидетельствует о загрязнении соответствующими выделениями.

Находя в исследуемом материале представителей микрофлоры полости рта, мы вправе думать о попадании слизи из дыхательных путей, в которой могут содержаться и возбудители скарлатины, туберкулеза, а обнаруживая нормальных обитателей кишечника, мы можем сделать заключение о наличии фекального загрязнения и возможной опасности присутствия возбудителей кишечных инфекций.

Выделяемые в этих случаях микробы служат показателями санитарного неблагополучия, потенциальной опасности исследуемых объектов, и потому названы **«санитарно-показательными»**. Однако не все микробы, входящие в состав нормальной флоры человека или животных, могут быть признаны таковыми.

Санитарно-показательные микроорганизмы должны:

1. Постоянно содержаться в выделениях человека и теплокровных животных и поступать в окружающую среду в больших количествах.
2. Они не должны иметь другого природного резервуара, кроме организма человека и животных.

3. После выделения в окружающую среду они должны сохранять жизнеспособность в течение сроков, близких к срокам выживания патогенных микробов, выводимых из организма теми же путями.
4. Они не должны размножаться в окружающей среде.
5. Они не должны сколько-нибудь значительно изменять свои биологические свойства в окружающей среде.
6. Они должны быть достаточно типичными, с тем, чтобы их дифференциальная диагностика осуществлялась без особого труда
7. Индикация, идентификация и количественный учёт должны производиться современными, простыми, легкодоступными и экономичными микробиологическими методами.

В настоящее время в категорию санитарно-показательных (индикаторных) микроорганизмов включены представители кишечной микрофлоры человека: БГКП (бактерии группы кишечной палочки), фекальные кишечные палочки (ФКП), к которым в основном относятся *E.coli*, бактерии группы протей, клостридии (*C.perfringens*), *E.faecalis*, колифаги. Показателями биологического загрязнения воздуха помещений являются стрептококки и стафилококки.

Непосредственное определение патогенных микроорганизмов в окружающей среде методически трудоемко и не всегда доступно. Поэтому правильно будет определять наличие санитарно-показательных микроорганизмов и проводить индикацию патогенных бактерий только тогда, когда это требует эпидемическая ситуация.

ЗАНЯТИЕ № 1

Знакомство с микробиологической лабораторией, техникой безопасности, микроскопом и микроскопией

Цель занятия

1. Ознакомить студентов с техникой безопасности и правилами работы в бактериологической лаборатории и на кафедре
2. Научить студентов с устройством микроскопа и техникой микроскопирования

Материалы и оборудование

Микроскопы и осветители; готовые окрашенные препараты микроорганизмов, рисунки и фотографии различных микроорганизмов

Содержание занятия

Техника безопасности в бактериологической лаборатории:

1. Заходить и работать в микробиологической лаборатории только в халате и чепчике.
2. Не вносить в лабораторию посторонних вещей.
3. На столе должно быть только необходимое для выполнения задания.
4. В помещение категорически запрещается принимать пищу и курить.
5. Приступать к работе можно только с разрешения преподавателя и всю работу проводить в строгом соответствии с изучаемой методикой.
6. Соблюдать опрятность и чистоту в работе.
7. Материал, используемый для учебных занятий, должен рассматриваться как опасный.
8. Во избежание взрыва не зажигать одну спиртовку от другой, использовать для этой цели спички или зажигалку.
9. Соблюдать правила обращения с химическими и другими реактивами.
10. При работе с бактериальными культурами или другим инфицированным материалом придерживаться общепринятых в бактериологической практике технических приемов, исключающих возможность заражения.
11. При попадании культуры из зараженного материала на стол, кожу, конъюнктиву, место протереть тампоном и продезинфицировать.
12. В конце занятия бактериальные культуры и другой материал сдать преподавателю, а рабочее место привести в порядок.
13. Уходя из лаборатории тщательно вымыть руки.

Оборудование рабочего места врача-бактериолога:

1. Спиртовая или газовая горелка;
2. Бутыль с системой слива, наполненная дистиллированной водой;
3. Сливная чашка с «мостиком»;
4. Набор красок и реактивов;
5. Контейнер с дезинфицирующим раствором для обработки рук (или с ватными тампонами, пропитанными 70° этиловым спиртом);
6. Емкость с дезинфицирующим раствором для отработанных стекол, пипеток;
7. Контейнер для хранения чистых обезжиренных стекол;
8. Набор бактериологических петель разного диаметра;
9. Лупа 5-кратного увеличения;
10. Микроскоп;
11. Нарезанная фильтровальная бумага для просушивания мазков;
12. Штатив для пробирок;

13. Маркер по стеклу или восковый карандаш;
14. Стерильные пастеровские и градуированные пипетки в упаковке.

Стены, пол, потолок, рабочая поверхность стола в боксе должны легко дезинфицироваться. Перед началом работы полы протирают дезинфицирующим раствором, воздух обеззараживают бактерицидными лампами. У входа в лабораторию, предбоксы и бокс кладут губчатые коврики, пропитанные дезраствором.

В комнате, где готовят питательные среды (средоварочная) для выращивания микроорганизмов, хранят стерильную посуду: пробирки, колбы, цилиндры, чашки Петри, пастеровские пипетки.

В моечной посуду кипятят, моют и готовят к стерилизации.

В автоклавной стерилизуют питательные среды, посуду, инструменты и обеззараживают отработанный инфицированный материал.

Микроскоп и микроскопия

Микроорганизмы являются чрезвычайно малыми объектами, которые становятся практически видимыми лишь при увеличении в 500-1000 раз. Такое увеличение дает микроскоп (от греч. *micro* – малый, *scopos* – смотрю) – оптический прибор для изучения микрообъектов.

Каждый микроскоп имеет две основные системы – механическую и оптическую (рис. 1).

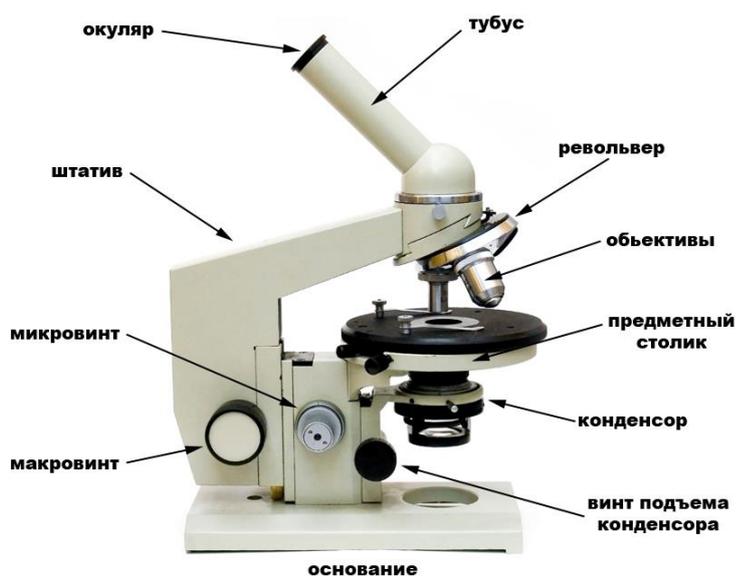


Рисунок 1 - микроскоп

Механическая часть микроскопа состоит из штатива, который делится на ножку и тубусодержатель. К тубусодержателю прикреплена труба микроскопа или тубус с вращающимся барабаном – револьвером на нижнем конце. Тубус передвигается макрометрическим винтом; для более тонкой наводки служит микрометрический винт. К ножке прикреплен предметный столик, на который помещают исследуемый препарат, закрепляемый зажимами. На предметном столике в некоторых микроскопах установлен препаратоводитель.

Оптическая система микроскопа состоит из зеркала, конденсора с ирисовой диафрагмой, объективов и окуляра.

При работе с конденсором используют вогнутое зеркало. Для освещения объективов применяют осветители.

Конденсор служит для лучшего освещения препарата. Он собирает отражённые от зеркала световые лучи в пучок и направляет их через отверстие предметного столика на препарат. При поднятии и опускании конденсора меняется угол сходимости лучей, падающих на препарат, вследствие чего меняется степень его освещённости.

Ирис-диафрагма состоит из ряда подвижных металлических пластинок, которые рычагом могут сдвигаться и раздвигаться. В результате этого отверстие диафрагмы сужается или расширяется.

Объективы представляют собой систему линз, заключенных в металлическую оправу. На оправу каждого объектива нанесены цифры, показывающие увеличение данного объектива: $\times 8$, $\times 20$, $\times 40$, $\times 90$.

Все объективы по способу употребления делят на сухие и иммерсионные (погруженные в масло или воду). У сухих между фронтальной линзой и рассматриваемым препаратом находится воздух, у иммерсионных пространство между фронтальной линзой и препаратом заполнено маслом (кедровым, касторовым, гвоздичным и др.), что устраняет светорассеяние. Стекло, на котором изготовлен препарат, стекло объективов и масло (кедровое) имеют почти одинаковый показатель преломления света (1,52 и 1,515). Лучи, проходя из одной среды в другую, почти не преломляются, свет не рассеивается, рассматриваемые объекты не искажаются и при этом бывают хорошо видны. Показатель преломления света, близкий к стеклу, имеют и другие вещества: касторовое масло (1,48-1,49), гвоздичное масло (1,53), смесь касторового и гвоздичного масел (1,515). Воздух и стекло имеют разный показатель преломления света (1,0 и 1,52), в результате чего лучи света при переходе из одной среды в другую

преломляются, рассеиваются, происходит частичное искажение рассматриваемых объектов. Но т.к. сухие системы дают сравнительно небольшое увеличение, то сильных искажения рассматриваемых объектов не наблюдается.

Иммерсионная система требует особенно осторожного обращения, во избежание повреждений линзы и препарата.

Окуляры состоят из двух линз: глазной и собирающей. На оправе окуляров обозначено увеличение $\times 5$ (22 мм), $\times 7$ (18 мм), $\times 10$ (13 мм), $\times 15$ (11 мм).

Общее увеличение микроскопа определяется произведением от увеличений объектива и окуляра (например, увеличение объектива $\times 40$, окуляра - $\times 10$, следовательно, увеличение микроскопа составляет $40 \times 10 = 400$ раз).

Чтобы микроскоп работал безотказно, он требует аккуратного и бережного отношения, и должен содержаться в чистоте и предохраняться от механических повреждений.

Порядок работы с иммерсионной системой микроскопа:

1. Готовят микроскоп к работе: проверяют взаимодействие всех его частей и их исправность.
2. На малом увеличении ($\times 8$) наводят свет и определяют участок микрофотографирования.
3. На выбранное место наносят каплю кедрового масла и осторожно (под контролем глаза сбоку) погружают в нее фронтальную линзу объектива ($\times 90$).
4. Тубус очень медленно поднимают, вращая сначала макро-, а затем микрометрический винт, при помощи которого настраивается ясное изображение объекта (микровинт поворачивают не более чем на 0,5 оборота в ту или другую сторону). Препарат рассматривают в нескольких полях зрения.
5. После просмотра препарата масло с иммерсионного объектива удаляют чистой салфеткой и переводят револьвер на объектив малого увеличения ($\times 8$).

Фазово-контрастная, люминесцентная и электронная микроскопия.

Фазово-контрастное устройство обеспечивает четкое изображение объектов. В основе этого метода лежит изменение фазы световых лучей при прохождении их через прозрачные объекты. С помощью фазово-контрастного устройства различия в фазе превращаются в изменение амплитуды, в результате чего прозрачные объекты становятся видимыми человеческим глазом.

Фазовые объективы отличаются от обычных тем, что имеют фазовую пластинку в виде темного кольца, которая помещается на внутренней поверхности линз (рис. 2).

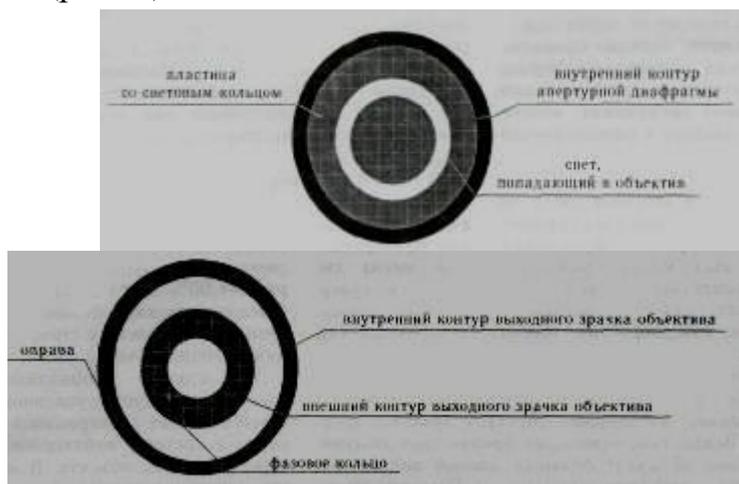


Рисунок 2 – схема фазового объектива

При люминесцентной (lumen-свет, escent-слабое действие) микроскопии препарат рассматривают в свете, излучаемом самим объектом во время облучения его ультрафиолетовыми или сине-фиолетовыми лучами с короткой длиной волн (явление флюоресценции). При этом наблюдается разнообразное свечение отдельных элементов рассматриваемого объекта в зависимости от их химической природы. Если собственное свечение объекта невелико или его нет, то препарат обрабатывают флюоресцирующими красителями (акридин, аурамин и др.), т.е. получают вторичную флюоресценцию. При люминесцентной микроскопии в качестве иммерсионной жидкости используют специальное нефлюоресцирующее масло (обычное иммерсионное масло для таких целей непригодно из-за собственной люминесценции). Преимущество люминесцентной микроскопии заключается в том, что она дает цветное изображение, высокую степень контрастности, возможность обнаруживать в исследуемом материале бактерии в небольших количествах. Люминесцентная микроскопия позволяет обнаружить ряд важных клеточных структур, изучить их изменения при

разных функциональных состояниях организма, различать мертвые и живые клетки, облегчает количественный подсчет микроорганизмов.

Первый люминесцентный микроскоп сконструирован в 1908 г. А. Келером и Г. Зидентокфом.

Электронная микроскопия. В электронном микроскопе пучок света заменен потоком движущихся электронов, вместо стеклянных линз – магнитные или электрические поля. В световом микроскопе изображение воспринимается глазом непосредственно, а в электронном оно видимо только на флуоресцирующем экране.

Электроны, прошедшие через объект, фокусируются объективной магнитной линзой, которая дает увеличенное изображение; третья магнитная линза (проекционная), в свою очередь, также увеличивает изображение, которое и попадает на экран.

Электронный микроскоп обеспечивает возможность эффективного визуального наблюдения и анализа структуры твердых тел неоднородного характера от 0,01 нм и менее до 10 нм.

Полезное увеличение сканирующей электронной микроскопии обычно не превышает 50 тыс.раз. С её помощью получают трехмерное изображение изучаемого объекта.

Задания для самостоятельной работы

Каждый студент микроскопирует несколько готовых окрашенных мазков-препаратов и схематически зарисовывает микрокартину в тетрадь.

Контрольные вопросы

1. Назначение и принцип устройства бактериологической лаборатории.
2. Правила поведения и работы в лаборатории
3. Методы микроскопического исследования
4. Принцип работы с иммерсионной системой микроскопа.

ЗАНЯТИЕ № 2

Питательные среды, техника их приготовления, способы посевов и культивирования микроорганизмов

Цель занятия

1. Изучить классификацию питательных сред, требования, предъявляемые к ним.

2. Освоить технику посевов микроорганизмов на питательные среды и их выращивание в термостате.

Материалы и оборудование

Набор сухих питательных сред, пробирки с МПБ, Китта-Тароцци, средами Гисса, чашки Петри с МПА, Эндо, Чапека, Сабуро и др. Бактериальные петли, игла, пастеровские пипетки, шпатели, спиртовки, культуры микроорганизмов, термостат и др.

Содержание занятия

Питательные среды предназначены для накопления, выделения, изучения и хранения микроорганизмов. Также для изучения морфологических, физиологических, культуральных, тинкториальных и биохимических свойств микроорганизмов в лабораторных условиях используют специально приготовленные питательные среды. В природе же микробы получают питательные вещества из распавшихся остатков растений и животных или живут за счет живых клеток.

Универсальной среды, на которой могли бы расти все микробы, нет, т.к. требования разных видов микроорганизмов к питательной среде различны. Но любая питательная среда должна быть:

- стерильными, чтобы имелась возможность размножить в них культуру только одного вида микроба.

- содержать определенные питательные вещества, из которых строится микробная клетка. Макроэлементы: азот, углерод, водород, кислород, фосфор, железо, калий, кальций, сера, магний. Микроэлементы: кобальт, йод, марганец, молибден, цинк, медь и др. Витамины. Все элементы должны находиться в легкоусвояемой для конкретного микроорганизма форме. Азот, например, одни бактерии усваивают из простых аммонийных соединений, другие нуждаются в аминокислотах, третьи с этой целью расщепляют пептоны. Патогенные виды требуют для своего размножения неизмененный белок. Источником углерода являются сахара, многоатомные спирты, органические кислоты, аминокислоты, белки. Источником остальных макроэлементов являются неорганические соединения – соли различных кислот. Микроэлементы поступают в питательную среду с органическими соединениями, солями и водой.

- изотоничными, т.е. иметь концентрацию солей, соответствующую концентрации солей в микробной клетке (для большинства микроорганизмов – 0,5%; для галофильных – 3%).

- иметь определенные рН. Питательные вещества могут усваиваться только при определенной реакции питательной среды, т.к. от этого показателя зависит проницаемость оболочки микробной клетки. Микробы могут размножаться при рН от 4,5 до 8,5; при этом оптимум роста наблюдается при рН 7,2-7,4 у большинства микробов.

- иметь достаточную влажность (не менее 20% воды), т.к. поступление веществ в микробную клетку осуществляется на основе законов диффузии и осмоса.

По происхождению питательные среды делятся на:

- 1) Естественные – молоко, яйца, картофель, желчь, сыворотка, которые используются в неизменном или почти неизменном виде.
- 2) Искусственные, которые готовят по определенным рецептам. Они могут быть
 - 2.1. Животного происхождения: мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар, мясо-пептонный желатин (МПБ, МПА, МПЖ)
 - 2.2. Растительного происхождения (отвары овощей и трав, пивное сусло)
 - 2.3. Синтетического происхождения. Их готовят из неорганических солей и определенных органических веществ (среды Гисса, среда Эндо, Левина, Олькеницкого, сахарно-кровяной агар Цейслера и др.)

По назначению питательные среды подразделяются на:

- 1) Простые (общеупотребительные или универсальные) среды, пригодны для культивирования большинства микробов; к ним относятся МПБ, МПА, МПЖ.
- 2) Специальные среды используют для выращивания таких микробов, которые на простых средах растут плохо:
 - 2.1. Среда Китта-Тароцци, сахарно-кровяной агар Цейслера – для культивирования анаэробов;
 - 2.2. Среда Сабуро, Чапека, сусло-агар – для культивирования плесневых грибов;
 - 2.3. Глюкозо-сывороточный бульон и агар – для стрептококков.
- 3) Дифференциально-диагностические среды применяют для изучения биохимических свойств микробов, позволяющих дифференцировать различные их виды. В состав этих сред кроме питательных веществ обычно включают субстрат, по отношению к которому дифференцируют бактерии, и индикатор.
 - 3.1. Среда Гисса – для изучения сахаролитических свойств микроорганизмов;

В состав сред Гисса входят сахара (лактоза, мальтоза, манит и др.) и индикаторы (нейтральрот, фуксин, лакмус и др.), растворенные в пептонной воде. Одни микробы ферментируют сахара с образованием кислоты, и в результате изменяется цвет среды; другие – с образованием газа, что характеризуется образованием пузырьков в толще среды. CO₂ улавливается специальными стеклянными трубочками. Запаянными с одного конца, называемыми газовками. Они находятся в пробирке с соответствующей средой Гисса.

3.2. МПЖ – для изучения протеолитических свойств микроорганизмов.

3.3 среда Эндо – для культивирования кишечной палочки.

- 4) Элективные (избирательные) среды используют для культивирования определенных микроорганизмов; в этих средах создаются благоприятные условия для размножения выделяемых бактерий и неблагоприятные для сопутствующей микрофлоры. В эти среды добавляют бактериостатические добавки (анилиновые краски, желчные соли, азид натрия, теллурид калия, антибиотики и др.), которые подавляют рост других микроорганизмов.
- 4.1. Ср. Петраньяни – для культивирования туберкулезных микобактерий содержит 2% раствор малахитового зеленого;
- 4.2. Среда Кесслера – для выделения кишечной палочки – бычью желчь и генциановый фиолетовый;
- 4.3. Среда Эндо – для кишечной палочки;
- 4.4. Кровяной новокаиновый МПА – для золотистого стафилококка;
- 4.5. Ср. Плоскирева – для сальмонелл и дизентерийных бактерий;
- 4.6. Висмут-сульфит агар – для сальмонелл, колонии которых на этой среде имеют черный цвет с металлическим блеском вокруг колоний и запахом сероводорода.

По физическому состоянию питательные среды делят на жидкие, полужидкие и плотные.

Приготовление питательных сред.

Мясная вода (МВ) служит основой для приготовления многих сред. Её готовят из говяжьего мяса или из конины, от молодых животных не старше 6 лет, свежего, не подвергавшегося замораживанию. Мясо освобождают от костей, фасций, сухожилий, нарезают на мелкие кусочки или пропускают через мясорубку. Добавляют двойное по весу количество водопроводной воды. Выдерживают в течение 16-18 часов в прохладном месте, чтобы питательные вещества поступили в воду (холодное экстрагирование) или нагревают до 50С в течение 1 часа (горячее экстрагирование). Затем смесь мяса с водой медленно нагревают до кипения и варят до готовности, периодически помешивая и снимая пену, в течение 40-60 минут.

Готовый бульон фильтруют в колбу через ткань (с отжимом) и через бумажный фильтр, доливают воду до первоначального объема, рН охлажденной смеси доводят до 7,0-7,2. Мясную воду разливают по колбам или пробиркам и стерилизуют в автоклаве при 1 атм ($t=121\pm 1^\circ\text{C}$) в течение 20 минут.

Печеночная вода (ПВ) – основа для среды Китта-Тароцци, мясо-пептонного печеночного бульона и агара. Свежую печень КРС освобождают от пленок, жира и нарезают на мелкие кусочки. Печень заливают двойным объемом водопроводной или дистиллированной воды, оставляют на холоде в течение 2 часов. Затем варят 1 час, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, доливают водой до исходного объема. Полученную печеночную воду можно стерилизовать в автоклаве 30 мин при 121°C .

Мясо-пептонный бульон (МПБ) – основой для приготовления служит МВ, к которой добавляют 1% пептона и 0,5% хлорида натрия. Жидкость нагревают до полного растворения пептона и соли, определяют и устанавливают рН 7,4-7,6 (с учетом того, что в процессе стерилизации рН снижается примерно на 0,2-0,3). После подщелачивания среду варят 30 мин на открытом огне или в автоклаве. Разливают по пробиркам 5 мл) и по колбам и стерилизуют при 1 атм 20-30 мин.

Пептон – это продукт неполного распада белков, содержит необходимые для нормального питания микробов источники азота и зольных элементов. Его получают из рубцов КРС и МРС. Поваренная соль создает условия изотонии, необходимые для нормального течения всех жизненных процессов в микробной клетке.

Мясо-пептонный агар (МПА) – предназначен для культивирования и изучения характера роста микробов на поверхности среды. Это плотная среда, по своей питательности она соответствует МПБ, но с целью уплотнения в среду добавляют агар.

Агар-агар – полисахарид, получаемый из морских водорослей – способен образовывать в воде гель, плавящийся при $t = 80-86^\circ\text{C}$ и застывающий при $40-45^\circ\text{C}$; не расщепляется большинством видов микробов.

МПА готовят из МПБ, добавляя 2-3% агар-агара и нагревают до полного расплавления агара, при этом выпадает осадок и снижается рН. Среду фильтруют в горячем виде через ватно-марлевый фильтр. Разливают в колбы или в пробирки по 5 мл, упаковывают и стерилизуют при 1 атм 20-30 мин. Эту среду используют в виде скошенного агара в пробирках и в виде пластинчатого агара в бактериологических чашках Петри. Скашивают МПА или разливают в чашки Петри непосредственно перед посевом на них микробов. С этой целью стерильную среду расплавляют в кипящей водяной бане, пробирки укладывают под углом 10° , после застывания в них

образуется скошенная площадка питательной среды. В чашки Петри агара разливают из колб в стерильном боксе с соблюдением правил асептики.

Мясо-пептонная желатина (МПЖ) – основой питательной среды служит МПБ с установленной рН 7,4-7,6. К МПБ добавляют пищевой желатин высшего сорта из расчета 10% зимой и 15% летом. После набухания желатины в течение 1-2 часов среду медленно нагревают на водяной бане при 40-50°C до полного расплавления при постоянном помешивании. Если среда мутная, её осветляют белком куриных яиц, после чего в горячем виде фильтруют через ватно-марлевый фильтр и разливают по пробиркам по 7-8 мл. Кипятить и автоклавировать среду нельзя. Стерилизацию осуществляют дробно в течение 3 дней по 30 мин текучим паром. Использовать МПЖ можно только при комнатной температуре или температуре холодильника.

Молоко – натуральная естественная питательная среда. Цельное молоко обезжиривают, центрифугируют, разводят водой 1:1, устанавливают рН 7,0-7,3 с помощью пищевой соды. Молоко стерилизуют дробно текучим паром 3 дня или в автоклаве при 0,5 атм/110°C – 20 мин. При изучении редуцирующих свойств микробов перед стерилизацией добавляют 2% раствор метиленового синего из расчета 2 мл краски на 100 мл среды.

Приготовление некоторых специальных питательных сред.

Обогащенные питательные среды, например, сахарные, глицериновые, сывороточные, кровяные – питательной основой для них служат МПБ или МПА, к которым добавляют соответствующий компонент, а затем стерилизуют. При этом сахарные и глицериновые среды стерилизуют дробно текучим паром. Сывороточные и кровяные среды не стерилизуют, их готовят из стерильных компонентов в стерильных условиях.

Сахарный МПБ и МПА (для выращивания анаэробов в трубках Вейона или по методу Перетца). К МПБ или расплавленному МПА прибавляют 0,5-2% глюкозы. Стерилизуют дробно.

Сывороточный МПБ и МПА (для выращивания стрептококков, пастерелл, бруцелл). К стерильному МПБ или расплавленному и охлажденному до 45-50°C МПА добавляют в асептических условиях (в стерильном боксе) 10-20% инактивированной сыворотки крови к.р.с. или лошади, перемешивают и разливают в стерильную лабораторную посуду.

Инактивация сыворотки – это освобождение её от нормальных антител (комплемента) путем прогревания в водяной бане при t 56-65°C в течение 30 минут.

Кровяной МПА (для культивирования различных микроорганизмов и изучения их гемолитических свойств). К стерильному расплавленному и охлажденному до 45-50°C МПА в асептических условиях добавляют 5-10% свежей дефибринированной крови кролика, барана, КРС. Кровяной агар быстро разливают в стерильные чашки Петри.

Для особенно прихотливых микроорганизмов, не растущих на универсальных средах, готовят специальные среды по особой рецептуре:

Среда Китта-Тароцци – специальная обогащенная, элективная среда для анаэробов. Для её приготовления используют говяжью печень, очищенную от пленок и жира, нарезанную кусочками по 30 гр. К печени добавляют МПБ в соотношении 1:3 и кипятят на слабом огне 30 мин. Бульон в горячем виде фильтруют через бумажный фильтр и устанавливают рН 7,6-7,8. Кусочки печени промывают на сите водой, нарезают на кубики по 1-1,5 г и раскладывают в пробирки по 4-5 кусочков. В пробирки наливают по 8-10 мл бульона и наслаивают вазелиновое масло толщиной слоя 5-10 мм. Пробирки закрывают пробками, связывают в пакеты и стерилизуют при 0,5 атм 30 мин. Анаэробные условия в этой среде создаются за счет: 1 – высокого столбика среды; 2 – слоя вазелинового масла; 3 – применения кусочков печени, которые обладают редуцирующими свойствами и активно связывают растворенный в среде кислород; 4 – перед посевом среду прогревают на кипящей водяной бане.

Сахарно-кровяной агар Цейслера (специальная обогащенная среда для анаэробов). На основе МПБ готовят МПА, но более плотный, чем обычно, содержащий 3% агар-агара, т.к. в процессе приготовления к среде будут добавляться жидкие компоненты. Устанавливают рН агара 7,6-7,8. Разливают в колбы по 100 мл и стерилизуют автоклавированием при 1 атм 30 мин. По мере надобности агар расплавляют на водяной бане, охлаждают до 45-50°C, добавляют в колбу 2% глюкозы (10 мл 20% ампульного раствора глюкозы) и 15-20 мл свежевзятой стерильной дефибринированной крови лошади, барана или КРС. Смесь осторожно перемешивают, не допуская образования пены, и разливают в стерильные чашки Петри. После застывания выдерживают в термостате 4-6 ч для подсушивания.

Среда Петраньяни (специальная обогащенная, элективная среда для выращивания возбудителей туберкулеза). Среда имеет сложный состав. Она содержит цельное молоко, пептон, крахмал, поваренную соль, 1 картофелину, 4 целых куриных яйца и 1 желток, глицерин, малахитовую зелень. В колбу наливают 150 мл молока, добавляют 1 г пептона, 6 г

картофельного крахмала, нарезанную сырую картофелину. Смесь нагревают на водяной бане до кипения и варят 10 мин до образования клейстера. Охлаждают до 50°C вливают яичную массу, 12 мл химически чистого глицерина, 10 мл 2% водного раствора малахитовой зелени. Перемешивают, фильтруют через 2 слоя марли и асептически разливают в стерильные пробирки. Стерилизуют в наклонном положении для образования скошенной поверхности дробно – в первый день при t 85°C в течение 2 ч и еще 2 дня при 75°C по 30 мин. Пробки заливают парафином или закрывают резиновыми пробками, чтобы среда не высыхала.

Желточно-солевой агар (среда Чистовича) – элективная среда для стафилококков. Элективными свойствами среда обладает за счет высокого процента натрия хлорида (6,5%). Стафилококки – галофильные, «любящие соль» микроорганизмы. В отличие от других микробов, они хорошо растут на солевом агаре. Для приготовления желточно-солевого агара Чистовича к 200 мл стерильного физ.раствора добавляют стерильно один желток и взбалтывают. 50 мл полученного желточного раствора стерильно добавляют к 150 мл расплавленного и охлажденного до 45°C 6,5% солевого МПА, тщательно перемешивают и разливают по чашкам Петри.

Приготовление некоторых дифференциально-диагностических сред

Дифференциально – диагностические среды
Среды «цветного ряда»:
Среды Гисса Полужидкий агар с индикатором ВР
Среды, используемые в санитарной микробиологии:
Среда Кода Среда Хейфеца Среда Кесслера
Плотные среды для дифференциации энтеробактерий:
Среда Эндо Среда Левина Среда Плоскирева Среда висмут-сульфит агар
Комбинированные среды для дифференциации энтеробактерий:
Трехсахарный агар с мочевиной по Олькеницкому
Среды для изучения различных биохимических свойств

микроорганизмов:

Среда Симмонса

Мясо-пептонная желатина

Молоко

Среди дифференциально-диагностических сред особое место занимают углеводные цветные среды. На этих средах изучают способность микробов расщеплять углеводы и многоатомные спирты. Цветные углеводные среды состоят из питательной основы (СПБ, МПА, ПВ), дифференцирующего углевода (1%) и индикатора (основной или кислый фуксин, настойка лакмуса, эозин и бромкрезолпурпур, водный голубой и розоловая кислота и т.д.). Среды стерилизуют текучим паром 20 мин или дробно.

Среды Гисса – в качестве питательной основы содержат ПВ. Дифференцирующие углеводы – *глюкоза, сахароза, лактоза, мальтоза, маннит, арабиноза, дульцит, салицин, сорбит, ксилоза, глицерин и др.* Индикатор сред Гисса – *индикатор Андре*. К среде его добавляют 1%, поэтому среда будет иметь слабо-желтый цвет. При росте микробов расщепляющих углеводы до кислот – индикатор Андре меняет цвет с *желтого на розовый*.

Для улавливания, образующегося при жизнедеятельности бактерий газа, в жидкие среды Гисса, разлитые по пробиркам, вносят поплавки (газовички). Это запаянные с одной стороны стеклянные трубочки.

Полужидкий агар с индикатором ВР (ПЖА с ВР) – аналог сред Гисса. Отличается от них содержанием агара (0,3%) и индикатором (комплексный индикатор – водный голубой и розоловая кислота). В норме среда становится ярко-голубой. Пузырьки образующегося газа застревают в толще ПЖА. Эта среда выпускается биологической промышленностью в сухом виде. Перед применением её готовят согласно указаниям на этикетках.

Часто дифференциально-диагностические среды используют в санитарной микробиологии при исследовании объектов внешней среды и пищевых продуктов. Эти среды обладают одновременно элективными свойствами. Среды Кода, Хейфеца, Кесслера и другие производят в сухом виде, готовят по прописи. Разливают в пробирки, стерилизуют текучим паром 20 мин.

Среда Кода – предназначена для выявления бактерий по признаку ферментации лактозы. Индикатор – бромтимоловый синий. Среда в пробирках жидкая, зеленого цвета. Лактозоотрицательные бактерии растут

на этой среде, не изменяя её цвета, а лактозоположительные – изменяют цвет среды на желтый. Среда ингибирует рост стафилококков и протей за счет наличия сульфанола.

Среда Хейфеца – предназначена для накопления и дифференциации кишечной палочки; содержит дифференцирующий углевод маннит и индикаторы – розоловую кислоту и водный раствор метиленового синего. Готовая среда жидкая, красновато-фиолетовая. При росте кишечной палочки происходит ферментация маннита, рН сдвигается в кислую сторону, среда приобретает зеленоватый цвет. Элективные свойства среды проявляются за счет действия метиленового синего.

Среда Кесслера – предназначена для накопления и выявления кишечной палочки, определения коли-титра. Содержит лактозу, генциановый фиолетовый и бычью желчь. Среда разливают в пробирки с поплавками. Среда Кесслера жидкая, фиолетового цвета. При росте кишечных палочек цвет среды *не меняется*, но становится менее ярким. Образующийся при расщеплении лактозы газ накапливается в газовичках в виде пузырьков. Генциановый фиолетовый и желчь ингибируют рост посторонней микрофлоры.

Для дифференциации бактерий группы кишечной палочки (БГКП) в бактериологических лабораториях применяют плотные дифференциально-диагностические среды Эндо, Левина, Плоскирева, висмут-сульфит агар и др. Одновременно эти среды являются элективными. Их выпускают в сухом виде, готовят согласно прописи.

Среда Эндо - состоит из МПА, лактозы и индикатора (фуксин, обесцвеченный 10% р-ром сульфита натрия). Колонии кишечной палочки на этой среде имеют красный с металлическим блеском цвет. Это объясняется тем, что микроб ферментирует лактозу с образованием альдегидов и кислот, которые разрывают непрочную связь между фуксином и сульфитом натрия и восстанавливают фуксин до первоначального (красного) цвета. В этой среде можно отличить кишечную палочку от схожей с ней сальмонелл, т.к. сальмонеллы не ферментируют лактозу.

Среда Левина (эозин-метиленовый агар) – низкоселективная дифференциально – диагностическая среда. Содержит МПА, лактозу, индикатор щелочной эозин и метиленовый синий. Цвет среды коричнево-фиолетовый (цвет «гнилой-вишни»). Лактозоположительные бактерии на этой среде образуют *темно-фиолетовые* или черные колонии,

лактозоотрицательные – *серовато-голубые* прозрачные колонии. Элективные свойства среде придают щелочной эозин и метиленовый синий.

Среда Плоскирева (бактоагар Ж) – высокоселективная дифференциально-диагностическая среда. Основные компоненты – МПА, лактоза, соли желчных кислот, кальцинированная сода, бриллиантовый зеленый. В качестве индикатора используют нейтральный красный. Цвет готовой среды розово-желтый (кирпичный). Лактозоположительные микроорганизмы на этой среде образуют *ярко-розовые*, брусничного цвета колонии, лактозоотрицательные – бесцветные *серо-желтые* колонии, вокруг которых среда желтеет. На среде Плоскирева не растут грамположительные микроорганизмы, ограничен рост гнилостных бактерий и многих энтеробактерий.

Висмут-сульфит агар (ВСА) – высокоселективная дифференциально-диагностическая среда для сальмонелл. ВСА – непрозрачная среда молочного-мутного цвета с зеленоватым оттенком. Дифференцирующее действие ВСА (в отличие от вышеназванных сред) зависит от способности бактерий образовывать сероводород. Который в химической реакции с сульфитом висмута дает сульфид черного цвета. В результате образуются колонии *черного* цвета. Бактерии, не образующие сероводород, вырастают в виде мелких бесцветных или *зеленовато-коричневых* колоний. Элективные свойства ВСА проявляются благодаря содержанию бриллиантового зеленого, висмут – аммония цитрата, железного купороса, щелочной рН (8,0).

Трехсахарный агар с мочевиной по Олькеницкому. Состав среды: 100 мл МПА, 0,1 г глюкозы, 1 г лактозы, 1 г сахарозы, 1 г мочевины, 0,02 г соли Мора (сложная соль железа), 0,03 г гипосульфита натрия и 0,4 мл 0,4% раствора фенолового красного.

Предварительно растворяют соль Мора с гипосульфитом в одной пробирке с небольшим количеством воды, в другой – мочевины с углеводами. Всё смешивают с расплавленным агаром и фильтруют через марлю. Разливают в пробирки и стерилизуют текучим паром дробно. В горячем виде скашивают так, чтобы у дна пробирки оставался небольшой столбик. Цвет готовой среды розовый. Биохимические свойства микробов определяют по следующим показателям:

- положение скошенной части среды указывает на расщепление лактозы и сахарозы;
- пожелтение столбика среды – расщепление глюкозы;

- восстановление розового цвета столбика среды указывает на расщепление мочевины;
- почернение столбика среды свидетельствует об образовании сероводорода;
- появление трещин и разрывов в толще среды говорит об образовании газов.

Среда Симмонса (цитратный агар) – используется для дифференциации энтеробактерий по способности утилизировать цитрат натрия. Это синтетическая среда, содержащая различные соли и индикатор бромтимоловый синий. Выпускают среду в сухом виде, готовят по прописи. Среда плотная оливково-зеленого цвета. Микробы (в т.ч. сальмонеллы), способные расщеплять цитрат натрия в качестве единственного источника углерода, при росте на этой среде изменяют её в **ярко-синий** цвет. Если способности расщеплять цитрат натрия у исследуемой культуры микроорганизмов нет, то среда остаётся **зелёной**, роста на ней не будет.

Мясо-пептонная желатина (МПЖ) – используется для изучения протеолитических свойств микроорганизмов.

На **молоке** можно изучать протеолитические и сахаролитические свойства микробов.

Задание для самостоятельной работы:

1. Внимательно рассмотреть и изучить демонстрацию питательных сред в пробирках и чашках Петри. Зарисовать их в рабочей тетради.
2. Используя навески сухих «коммерческих сред», приготовить среды МПА, ср.Гисса и прочее, разлить готовые среды в стерильные чашки Петри и пробирки.

Контрольные вопросы:

1. Как готовят МПБ, МПА, как их стерилизуют?
2. Каково назначение специальных питательных сред?
3. Какие элективные питательные среды Вы знаете? Для чего они применяются?
4. На чём основан принцип использования среды Китта-Тароции, желточно-солевого агара Чистовича, висмут-сульфит агара, среды Кода, Кесслера?

ЗАНЯТИЕ №3

Способы посевов и культивирования аэробных микроорганизмов. Методы выделения чистой культуры.

Цель занятия:

1. Изучить способы посевов и пересевов микроорганизмов на питательные среды, способы культивирования аэробов.
2. Изучить способы выделения чистой культуры.

Материалы и оборудование:

Смесь микробов в изотоническом растворе натрия хлорида, пробирки с культурами микробов, МПА, МПБ, микробиологические петли, иглы, шпатели, пастеровские пипетки, спиртовки, спички.

Содержание занятия:

Посев – внесение микробов из исследуемого материала в стерильную питательную среду.

Пересев – перенос культуры микроба с одной питательной среды на другую, новую стерильную питательную среду.

Отвивка – перенос микробной колонии с плотной питательной среды на другую питательную среду (плотную или жидкую).

Материалом для посева могут быть различные выделения животных и человека, органы трупа, вода, почва, а также пересеваемые культуры микроорганизмов.

Размножение микроорганизмов осуществляется на питательных средах. Посев патологического материала или культуры микробов на такие среды проводят микробиологической иглой, петлей, пастеровскими пипетками. Предварительно их стерилизуют в автоклаве или фламбируют над пламенем спиртовки. Если материал жидкий, то без всякой подготовки пригоден для посева. Плотный материал сначала эмульгируют в физиологическом растворе или растирают в ступке с последующим добавлением физиологического раствора.

При посеве в пробирку последнюю держат наклонно (но так, чтобы не замочить пробку) в левой руке между большим и указательным пальцами. Если производят посев из одной пробирки в другую, то обе пробирки (с культурой и питательной средой) держат рядом в одном положении в левой руке.

После того, как петля прокалена, проводят через пламя горелки пробки и края пробирок. Вынимают одновременно обе пробки, зажимая их между мизинцем и ладонью правой руки, обжигают края пробирки с культурой и

вводят в неё петлю или пипетку. Охлаждают петлю о стенки пробирки и захватывают ею материал, который вносят в пробирку с питательной средой. Если среда плотная, то делают посев штрихом. При этом, не касаясь среды, вводят петлю в глубь пробирки, затем слегка прикасаясь петлей к среде, но не нарушая её целостности, делают штрих снизу вверх.

Также проводят **посев «уколом»** в глубь среды. Для этой цели материал берут бактериологической иглой. Пробирку с плотной средой, налитой высоким столбиком, держат дном вверх; иглу вкалывают отвесно в поверхность среды и продвигают её по оси пробирки до самого дна. На пути прохождения иглы остаются микробы, они могут расти по уколу.

Посев на скошенный агар. Пробирку берут в левую руку. Пробку из пробирки вынимают мизинцем правой руки, прижав её к ладони. При этом нельзя касаться пальцами той части пробки, которая входит в пробирку. Петлю с исследуемым материалом опускают на поверхность питательной среды у дна пробирки и скользящими движениями делают посев штрихом снизу вверх.

Посеяв материал, закрывают пробирки. Пронеся пробки через пламя, и хорошо прокалывают петлю. Если посев производят пастеровской пипеткой, то последнюю опускают в дезинфицирующий раствор.

Посев на поверхность плотной питательной среды.

- **посев бактериологической петлей** – левой рукой приоткрывают чашку Петри, бактериологической петлей посевной материал наносят на поверхность среды у края чашки и распределяют его параллельными штрихами по стерильной поверхности среды. Петлю после посева фламбируют в пламени горелки;

- **посев шпателем** – материал наносят на поверхность среды бактериологической петлей или пастеровской пипеткой, а затем стеклянным или металлическим шпателем тщательно втирают его по всей поверхности агара. При этом левой рукой придерживают слегка приоткрытую крышку и одновременно вращают чашку. После посева металлический шпатель фламбируют, а стеклянный помещают в дезраствор;

- **посев тампоном** – тампон с исследуемым материалом вносят в чашку и круговыми движениями втирают его содержимое в поверхность среды. После посева тампон помещают в дезраствор;

- **посев отпечатком** – в лабораторной практике допускается проводить посев кусочком пробы (лимфатический узел, кусочки паренхиматозных органов и т.д.) путем нанесения отпечатков разными

сторонами образца на поверхность питательной среды. Предварительно каждую пробу погружают на 2-3 мин в спирт, затем обжигают поверхность. После этого стерильными ножницами из глубины различных участков пробы вырезают кусочки размером не менее 2×1,5×2,5 см, которыми и производится посев;

- **посев «газоном»** - 1 мл исследуемого материала (жидкая бульонная культура или взвесь микробов в физиологическом растворе) наносят пипеткой на поверхность среды и тщательно распределяют жидкость по всей её поверхности. Избыток материала отсасывают пастеровской пипеткой и вместе с ней помещают в дезинфицирующий раствор.

Чтобы получить **изолированные колонии** на поверхности или в глубине плотной питательной среды, или **выделить чистую культуру** существуют способы дробного посева микроорганизмов.

Микробная колония – это потомство или популяция одной микробной клетки при росте на плотных питательных средах, в этой колонии микробы являются клонами.

Дробный посев по Дригальскому:

а) Метод посева в расплавленный МПА по методу Коха.

МПА, разлитый в пробирки по 10 мл, расплавляют на водяной бане, охлаждают до 45-55°C. Всего берут 3-5 пробирок каплю исследуемой культуры вносят в первую пробирку, хорошо смешивают и переносят одну каплю жидкости во вторую пробирку. Из второй пробирки каплю жидкости переносят в третью пробирку и т.д.

Затем содержимое каждой пробирки выливают в подогретые и стерильные чашки Петри, открывая её крышку настолько, чтобы в щель входило горлышко пробирки. Осторожным покачиванием чашки распределяют агар равномерно по всей поверхности дна. Когда агар застынет, переворачивают чашки крышкой вниз и ставят в термостат на 18-24 часа.

В чашках Петри, в которые вылито содержимое последних пробирок, можно получить изолированные колонии микробов. Посев такую колонию на питательную среду, получают чистую культуру определенного вида микроорганизма.

б) Метод рассева на чашках Петри.

Берут несколько чашек Петри и разливают в них 10-15 мл расплавленного МПА. Когда агар застынет, в центр первой чашки вносят каплю исследуемой культуры и растирают её по всей поверхности агара стеклянным шпателем. Не прожигая шпатель, быстро переносят его во

вторую чашку и растирают оставшийся на шпателе материал по всей поверхности агара. Этим же шпателем производят посев в третью чашку. Когда посев окончен, шпатель обжигают, чашки подписывают и ставят в термостат вверх дном на 18-24 часа. В последние чашки попадает меньше микробов, а, следовательно, меньше вырастает колоний, которые могут быть изолированы, что позволяет выделить чистую культуру.

в) Модифицированный метод по Дригальскому на плотной среде в одной чашке, **разделенной на 3 сектора**. Бактериологическую петлю погружают в жидкий исследуемый материал, а затем делают на поверхности среды первого сектора 4-5 отдельных штрихов. Петлю обжигают, охлаждают, затем, проведя один раз поперек предыдущего посева, делают 4-5 штрихов во втором секторе. После этого вновь прожженной и охлажденной петлей проводят однократно по посеву второго сектора, не касаясь его первого штриха, производят посев сплошной линией в третьем секторе. Как правило, в третьем секторе вырастают изолированные колонии.

В данном методе можно использовать микробиологический шпатель, производя посев, как описано в «б», но только на одной чашке Петри, разделенной на три сектора.

ЗАНЯТИЕ №4

Методы выделения чистой культуры и культивирования анаэробных микроорганизмов

Цель занятия: освоить методы выделения чистой культуры анаэробных микроорганизмов из материалов, содержащих смешанную микрофлору; ознакомиться с методами создания анаэробных условий и с приборами для культивирования анаэробов.

Материалы и оборудование: набор сред для анаэробов (Китта-Тароцци, молоко с кусочками печени, сахарный МПА в пробирках, ПЖА с глюкозой и индикатором ВР, среда Вильсона-Блера, сахарно-кровяной агар Цейсслера; трубки Вейона, чашки по Перетцу, анаэроустат, эксикатор с индикаторной марлей, бикарбонат натрия и гидросульфит натрия в пробирках; культуры анаэробов в среде Китта-Тароцци; колонии различных микроорганизмов на МПА в чашках Петри; стерильный физиологический раствор в пробирках, бактериологические петли, пастеровские пипетки, резиновые груши со шлангами, лупа, предметные стекла.

Содержание занятия:

Анаэробы – это большая группа микроорганизмов, которые растут и размножаются при отсутствии кислорода воздуха. Они дышат и получают энергию для своей жизнедеятельности за счет расщепления органических веществ по принципу дегидрирования.

Для выращивания анаэробов необходимо создать определенные условия, сущность которых состоит в том, чтобы удалить молекулярный кислород из окружающей среды.

Физический метод создания анаэробных условий.

Выращивание культур анаэробов в специальных приборах – анаэростатах (рис. 4), из которых откачивается воздух с помощью механического насоса. В приборе создается отрицательное давление, уровень которого контролирует манометр. Для культивирования строгих анаэробов достаточно снизить давление до 1 мм.



Рисунок 4 - анаэростат

Чашки с посевами помещают в анаэростат вверх крышкой, герметично закрывают крышку анаэростата, откачивают из него воздух и помещают в термостат. Учет роста проводят через 24-48 ч. Можно вместо откачивания воздуха заменить его инертным газом (азотом, аргоном, гелием), или бескислородной газовой смесью.

Химические методы создания анаэробных условий.

Эти методы основаны на поглощении свободного кислорода воздуха в результате химической реакции. Реактивы смешивают, слегка увлажняют водой и в открытой чашке ставят на дно эксикатора (рис. 5) непосредственно перед размещением в нём чашек с посевами.

В качестве реактивов, активно поглощающих кислород, используют *гидросульфит натрия и бикарбонат натрия* в равных количествах из расчета 30 г общего веса на 1 л ёмкости прибора.



Рисунок 5 - эксикатор

Для связывания кислорода можно использовать 100 мл свежеприготовленного 20% раствора *гидросульфита натрия* и 16 мл 50% *КОН*. Эти реагенты связывают кислород быстрее. Часто с такой целью используют *пирогаллол*.

В настоящее время в лабораториях используют специальные коммерческие *газогенерирующие системы в газонепроницаемых пластиковых пакетах* (рис.6).



Рисунок 6 – газогенирирующие системы в газонепроницаемых пластиковых пакетах

Биологический метод создания анаэробных условий.

Способ, основанный на совместном выращивании аэробов с анаэробами.

Посев производят в чашки Петри с кровавым сахарным агаром. Посередине чашки вырезают тонкую полоску агара, таким образом деля чашку Петри на две половины. На одну половину засевают культуру аэробов (как правило, используют *Bacillus subtilis* – сенная палочка, строгий аэроб), на вторую – культуру анаэробов. Края чашки Петри заливают парафином и

помещают в термостат. Сначала начинают расти аэробы, когда же порционное давление кислорода в чашках снижается, начинают расти анаэробы.

Применение специальных питательных сред.

Для культивирования анаэробов используют специально приготовленные питательные среды: Китта-Тароцци, кровяной сахарный агар, сахарный МПБ и МПА и др.

Также существуют и другие способы культивирования анаэробов, например, Метод Виньял-Вейона, когда в расплавленный и остуженный до 50° С агар вносят исследуемую анаэробную культуру, перемешивают и засасывают в пастеровскую пипетку, конец которой запаивают. Через 24 — 48 часов в столбике агара вырастают ясно видимые колонии микробов — анаэробов.

Метод Перетца: Исследуемый материал вносят в 3 пробирки с физиологическим раствором, а затем в 3 пробирки с остуженным до 50° С МПА. Содержимое пробирок перемешивают и выливают в 3 стерильные чашки Петри, на дно которых предварительно кладут стерильное предметное стекло, через 18-20 часов инкубации в термостате под пластинками стекла вырастают анаэробы.

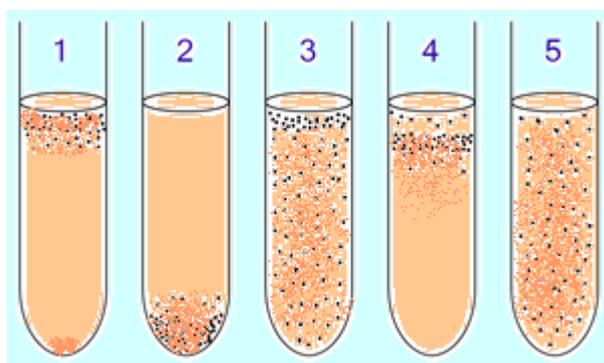


Рисунок 7 - Аэробные и анаэробные бактерии предварительно идентифицируются в жидкой питательной среде по градиенту концентрации O_2 : **1. Облигатные аэробные** бактерии в основном собираются в верхней части пробирки, чтобы поглощать максимальное количество кислорода. (Исключение: микобактерии — рост пленкой на поверхности из-за восколипидной мембраны.) **2. Облигатные анаэробные** бактерии собираются в нижней части, чтобы избежать кислорода (либо не дают роста). **3. Факультативные** бактерии собираются в основном в верхнем слое среды (окислительное фосфорилирование является наиболее выгодным, чем гликолиза), однако они могут быть найдены на всем протяжении среды, так как от O_2 не зависят. **4. Микроаэрофилы** собираются в верхней части пробирки, но их оптимум — малая концентрация кислорода. **5. Аэротолерантные анаэробы** не реагируют на концентрации кислорода и равномерно распределяются по пробирке.

Нужно иметь в виду, что этот способ **не достоверный**, а только лишь позволяет **предварительно идентифицировать** аэробы от анаэробов в жидкой питательной среде для дальнейшего изучения.

ЗАНЯТИЕ №5

Приготовление бактериоскопического препарата и методы его окраски.

Простой метод окраски

Цель занятия:

1. научить студентов технике приготовления бактериоскопических препаратов из агаровых и бульонных культур.
2. Научить студентов простому и сложным методам окраски микроорганизмов.
3. Научить проводить микроскопию окрашенных препаратов и определять форму микробов.

Материалы и оборудование:

1. Набор красителей: водный раствор фуксина Пфейффера, раствор метиленовой синьки Леффлера (или фильтровальные бумажки пропитанные генцианвиолетом), раствор Люголя, водный раствор нейтральрота, карболовый фуксин, 5% раствор серной кислоты, 96 ° этиловый спирт.
2. Бактериологические петли, штативы, бульонные и агаровые культуры микробов, предметные стёкла, физиологический раствор, дистиллированная вода, иммерсионное масло, микроскопы с осветителями, дезраствор, спиртовки, спички, сливные чашки с мостиками, фильтровальная бумага.

Содержание занятия:

Изучение микроорганизмов в окрашенных препаратах даёт возможность студентам отчётливо рассмотреть форму микробной клетки, а иногда и детали её структуры и т.д.

Прежде всего готовят бактериоскопический препарат – мазок из культуры микробов или отпечаток из органов и тканей животного на предметном стекле.

Техника приготовления бактериоскопического препарата:

1. Для приготовления мазка необходимо иметь чистые и обезжиренные предметные стекла. Непосредственно перед приготовлением мазка, предметное стекло следует провести несколько раз через пламя спиртовки. Предметное стекло кладут на стол рядом со спиртовкой.
2. Пробирку с культурой держат большим и указательным пальцами левой руки. Петлю держат в правой руке и прокалывают её над пламенем

спиртовки. Не выпуская петли, мизинцем правой руки прижимают пробку к ладони и осторожно вынимают ее из пробирки. Горло пробирки обжигают в пламени горелки. Вводят петлю в пробирку. Охлаждают петлю о стенку пробирки и затем погружают её в культуру. Вынимают петлю, не касаясь ею стенок пробирки. Закрывают пробку, предварительно проведя ее через пламя горелки. Ставят пробирку в штатив. Петлей наносят культуру на предметное стекло, круговыми движениями равномерно распределяя ее. Затем петлю прожигают в пламени горелки. Мазок оставляют для высыхания.

Если мазок делают из агаровой культуры, то вначале на стекло наносят каплю физиологического раствора, затем петлей захватив немного материала, размещают его в капле и делают мазок, придерживаясь вышеописанной методики.

3. Мазок высушивают на воздухе. Подогревать мазок нельзя, т.к. при быстрой отдаче влаги происходит грубое свёртывание белков и клетки теряют свою первоначальную структуру. Чтобы препарат быстрее высох, его можно держать высоко над пламенем спиртовки в струе тёплого воздуха или поместить в термостат.
4. Высушенный мазок фиксируют, т.е. проводят тыльной стороной над пламенем спиртовки 3-4 раза с 5-6 – секундными промежутками или погружают в специальные жидкости – фиксаторы: спирт-ректификат – в течение 15-20 мин, смесь спирта с эфиром (поровну) – в течение 5 мин, хлороформ – на несколько секунд. При фиксации происходит обеззараживание микробов и приклеивание их к стеклу. Фиксированный мазок окрашивается легче, т.к. мёртвые клетки прокрашиваются лучше, чем живые.

***Приготовление мазка из гноя или мокроты.** Материал забирают стерильной пипеткой или петлей и наносят на середину предметного стекла. Вторым предметным стеклом покрывают первое так, чтобы свободными остались треть первого и второго стекол. Стекла с усилием раздвигают в стороны. Получают два больших мазка.*

***Приготовление мазка из крови.** Каплю крови наносят на предметное стекло на расстоянии одной трети от левого края. Затем краем специально отшлифованного стекла, наклонив его под углом 45°, прикасаются к капле крови. Прижимая отшлифованное стекло к предметному продвигают его вперед. Правильно приготовленный мазок имеет желтоватый цвет и просвечивает.*

***Приготовление мазков-отпечатков из внутренних органов трупов и пищевых продуктов твердой консистенции.** Поверхность органа или пищевого продукта прижигают раскаленным скальпелем и из этого участка вырезают кусочек материала. Пинцетом осторожно захватывают этот кусочек и поверхностью среза*

прикасаются к предметному стеклу в двух - трех местах, делая ряд мазков-отпечатков.

Красители. При окрашивании мазка краситель проникает в микробную клетку. Это даёт возможность рассматривать не только её внешние признаки, но и некоторые особенности внутренней структуры, например, споры. В микробиологической практике используют основные и кислые красители. Микробы, как и ядра клеток, окрашиваются основными красителями, реже нейтральными. Кислые красители служат для создания фона, что увеличивает контрастность неокрашенных форм.

Наиболее употребительны следующие красители: красные (фуксин основной, фуксин кислый, конго красный, нейтральный красный); синие (метиленовый и толуидиновый); фиолетовые (генциановый, метиловый, кристаллический); коричнево-желтые (везувин, хризоидин); зеленые (бриллиантовый, малахитовый).

Все красители выпускают в виде аморфных или кристаллических порошков. Из них готовят насыщенные спиртовые и феноловые растворы, а затем для работы используют водно-спиртовые или водно-феноловые растворы красителей. Если при окраске используют концентрированные растворы красителей, то препарат предварительно накрывают фильтровальной бумагой, на которую наносят краситель. При этом кусочки красителя остаются на бумаге.

Рецепты красителей

1. Насыщенные спиртовые растворы (исходные):

красителя - 1 г спирта 96% - 10 мл

Смесь помещают в термостат до полного растворения на несколько дней.

Взбалтывают ежедневно. Хранят в склянках с притертыми пробками.

2. Карболовый фуксин Циля (для окраски кислотоустойчивых микроорганизмов, спор и капсул):

насыщенного спиртового раствора основного фуксина - 10 мл раствора

карболовой кислоты 5% - 90 мл

Внимание! Карболовую кислоту вливают в краситель, а не наоборот.

Смесь в течение нескольких минут энергично встряхивают, фильтруют и сливают во флакон для хранения.

3. Фуксин Пфейффера (для окраски по Граму и для простого метода окраски):

Фуксина Циля - 1 мл воды дистиллированной - 9 мл

Краситель готовят непосредственно перед применением.

4. Карболовый генциановый фиолетовый (для окраски по Граму):

насыщенного спиртового раствора генцианового фиолетового - 10 мл
карболовой кислоты 5% - 100 мл

Растворы смешивают и фильтруют через бумажный фильтр.

5. Раствор Люголя (для окраски по Граму и реактив на крахмал):

йодида калия - 2 г

кристаллического йода - 1 г

дистиллированной воды - 25 мл

Смесь помещают в бутылку матового стекла, хорошо закупоривают и ставят на сутки в термостат, затем добавляют 300 мл дистиллированной воды.

6. Щелочной раствор метиленового синего Леффлера:

насыщенного спиртового раствора метиленового синего - 30 мл

раствора гидроксида калия 1% - 1 мл

дистиллированной воды - 100 мл

7. Бумажки по Синеву (для окраски по Граму):

1% спиртовой раствор кристаллического фиолетового

Полоски фильтровальной бумаги пропитывают раствором и высушивают.

Методы окраски делят на ориентировочные (простые) и дифференциальные (сложные), выявляющие химические и структурные особенности бактериальной клетки.

8. Сафранин

2 г красителя растворяют в 100 мл смеси (спирт 96% и дистиллированная вода поровну), или в 100 мл кипящей дистиллированной воды. Фильтруют. Используют при окрашивании бруцелл, а также капсул возбудителя сибирской язвы.

9. Малахитовый зелёный (водный раствор)

12 г краски

100 мл дистиллированной воды

Используют при окрашивании бруцелл.

Простой метод окраски.

1. На высушенный и зафиксированный мазок наливают несколько капель краски (чаще всего метиленовой синьки или разведенного фуксина) и держат 2-3 минуты.
2. Краску сливают и мазок промывают лёгкой струёй воды.
3. Препарат высушивают фильтровальной бумагой, наносят каплю иммерсионного масла и рассматривают под микроскопом при увеличении объектива $\times 90$.

Простой метод окраски позволяет обнаружить микробы, определить их форму и взаиморасположение (рис. 8).

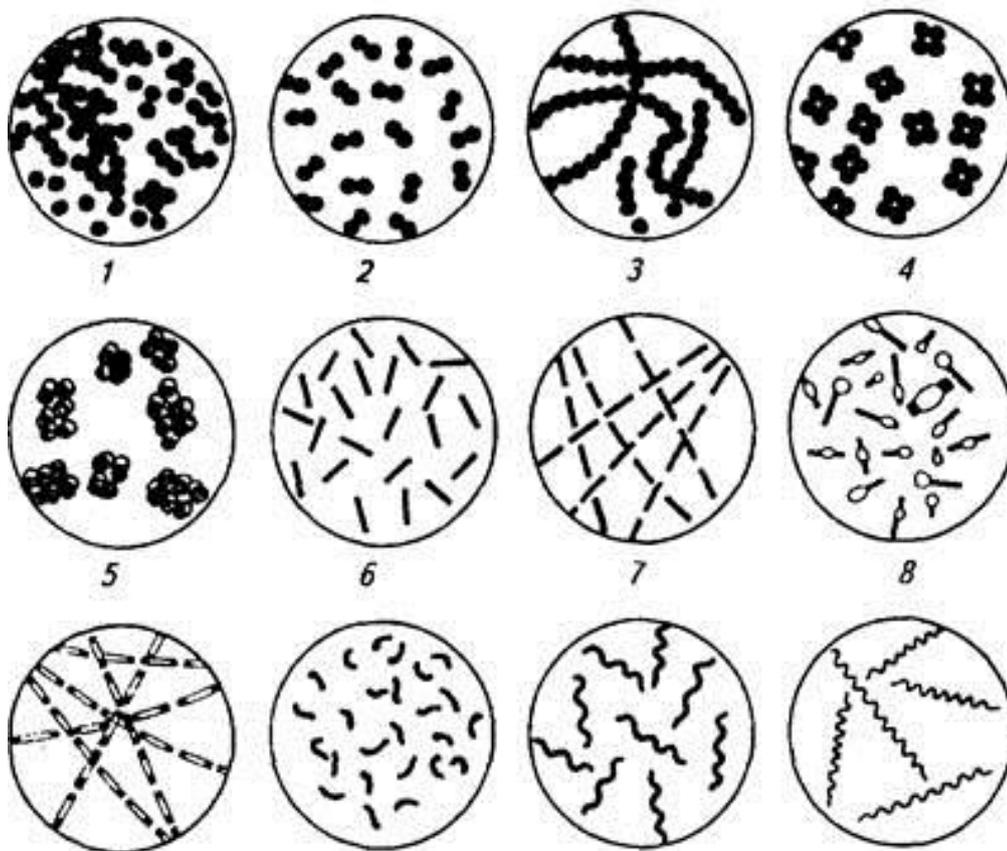


Рисунок 8 – формы микроорганизмов. 1 – стафилококки, 2 – диплококки, 3 – стрептококки, 4 – тетракокки, 5 – сарцины, 6 – бактерии, 7 – стрептобактерии, 8 – бациллы, 9 – стрептобациллы, 10 – вибрионы, 11 – вибриллы, 12 – спирохеты.

Задание для самостоятельной работы:

1. Приготовить бактериоскопический препарат;
2. Освоить простой метод окраски
3. Провести микроскопию приготовленных мазков, определить форму микробов, зарисовать в тетрадь.

Контрольные вопросы:

1. Рассказать о технике приготовления бактериоскопического препарата;
2. Рассказать о простых методах окраски.

ЗАНЯТИЕ №6

Сложные методы окраски

Цель занятия: освоить окраску по Граму, изучить методы окраски по Пешкову, по Михину, по Циль-Нильсену

Материалы и оборудование: чашки Петри с выросшими колониями, предметные стёкла, микроскопы, осветители, микробиологические петли, сливные чашки, сливные колбы, сливные мостики, наборы для окрашивания по Граму, плакаты.

Содержание занятия:

Сложные методы окраски применяются для выявления некоторых структурных элементов микробной клетки, для окраски бактерий, не подлежащих окраске обычными методами, а также для дифференциально – диагностических целей. К наиболее широко применяемым методам сложной окраски относятся методы Грама, Циля-Нильсена, Романовского-Гимзы и др.

1. Окраска по Граму.

Этот метод окраски предложил Христиан Грам в 1884 году. По Граму (Гр) окрашиваются молодые культуры, старые не обладают такой способностью. По отношению к окраске по Граму все бактерии делятся на две группы: Гр (+) и Гр (-) – грамположительные и грамотрицательные.

У Гр (+) микробов цитоплазма имеет более кислую среду (рН=2-3); у Гр (-) – щелочную (рН=4-5). В поверхностном слое цитоплазмы Гр (+) микробов содержится магниевая соль РНК, которая в кислой среде в присутствии йода образует прочные соединения с генцианвиолетом, остающиеся окрашенными в фиолетовый цвет даже после действия этилового спирта.

У Гр(-) микроорганизмов не образуется прочного соединения, они обесцвечиваются спиртом. Такие клетки затем окрашиваются фуксином Пфейффера в красный цвет.

Возможно, здесь играет роль неодинаковая проницаемость для комплекса – «краситель + йод» клеточной оболочки и цитоплазматической мембраны в связи с большим содержанием в клеточной стенке Гр(+) микробов муреина (от 50 до 90%) и меньшим у Гр (-) (от 1 до 10%).

Техника окраски:

1. На фиксированный мазок кладут кусочек фильтровальной бумаги и на него наливают раствор генцианвиолета или на мазок кладут фильтровальную бумагу, заранее пропитанную генцианвиолетом и высушенную, которую смачивают водой;

2. Через 2 минуты бумагу удаляют, краску сливают и на мазок наливают раствор Люголя на 2 мин;
3. Сливают раствор Люголя и действуют 96% спиртом в течение 30 сек;
4. Промывают водой;
5. Дополнительно окрашивают в течение 2-3 мин раствором фуксина;
6. Промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой.
7. Приготовленный таким образом мазок рассматривают под иммерсионным объективом микроскопа.

Микроскопическая картина: Гр (+) бактерии окрашены в синий или фиолетовый цвет; Гр(-) – красные или розовые.

К Гр(+) бактериям относятся почти все виды патогенных кокков, возбудитель сибирской язвы, палочки рожи свиней, многие анаэробы и др.;

К Гр(-) – бруцеллы, энтеробактерии и др.

Отношение к окраске по Граму является важным диагностическим признаком и обязательно упоминается при характеристике вида микроба.

2. Окраска спор по М.А. Пешкову:

1. На фиксированный в пламени препарат наливают метиленовый синий Леффлера, доводят его до кипения и кипятят 15—20 с, держа стекло над пламенем.
2. Мазок промывают водой и докрасивают в течение 30 сек 0,5%-ным водным раствором нейтрального красного.
3. Еще раз промывают водой, подсушивают и далее исследуют препарат с масляной иммерсией объектива.

Микроскопическая картина: споры окрашиваются в голубой или синий цвета, цитоплазма вегетативных форм — в розовый.

4. Окраска капсул методом Михина:

Дает хорошие результаты только при наличии старой синьки Леффлера, способной за счет образования азура давать разноцветное окрашивание тел и капсул микробов.

1. Мазок красят синькой 3-5 мин при подогревании до отхождения паров,
2. быстро споласкивают сильной струёй воды и быстро подсушивают.

Микроскопическая картина: бактерии синие, капсулы розовые.

Окраска капсул методом Ольта

1. Мазок окрашивают 2-3 % водным раствором сафранина в течение 1-3 минут,
2. быстро смывают водой.

3. Раствор сафранина готовят перед употреблением, растворяя краску в горячей воде с последующим фильтрованием. На мазок наносят каплю воды, накрывают покровным стеклом, а на него помещают каплю иммерсионной жидкости.

Микроскопическая картина: капсулы – бледно-желтого, а бактерии – коричневого цвета.

5. Окраска кислотоустойчивых бактерий

Кислотоустойчивые бактерии (возбудители туберкулёза, паратуберкулёзного энтерита крупного рогатого скота, проказы человека и др.) обычными красками окрашиваются плохо и поэтому при их окрашивании применяют концентрированные растворы красок при подогревании. Но, восприняв ту или иную краску, они не обесцвечиваются даже при воздействии кислот и спиртов (исключение представляют некоторые виды сапрофитных кислотоустойчивых бактерий, которые обесцвечиваются спиртом и крепким раствором минеральных кислот). Это свойство кислотоустойчивых бактерий используют для их дифференциальной диагностики.

Кислотоустойчивость всегда сопровождается способностью бактерий окрашиваться Гр (+).

Патогенные кислотоустойчивые бактерии содержатся в материале, который часто загрязнён другими микробами (гной, мокрота, молоко, каловые массы). При исследовании такого материала применяют специальные методы окраски, при которых кислотоустойчивые бактерии окрашиваются иначе, чем остальная микрофлора. Наиболее часто применяют окраску по Циль-Нильсену.

Метод окраски по Циль-Нильсену:

1. Фиксированный на пламени мазок покрывают полоской фильтровальной бумаги, наливают на нее карболовый раствор фуксина и подогревают при подогревании до отхождения паров 5 минут.
3. Обесцвечивают препарат 5—10% водным раствором серной кислоты в течение 3—5 секунд (до желтоватого оттенка мазка).
4. Мазок тщательно промывают водой.
5. Споласкивают 96° спиртом.
6. Снова промывают водой.
7. Докрашивают в течение 3—5 минут леффлеровской метиленовой синькой.

8. Краску смывают водой и препарат высушивают.

Микроскопическая картина: кислотоустойчивые бактерии окрашены в рубиново-красный цвет, остальная микрофлора синяя.

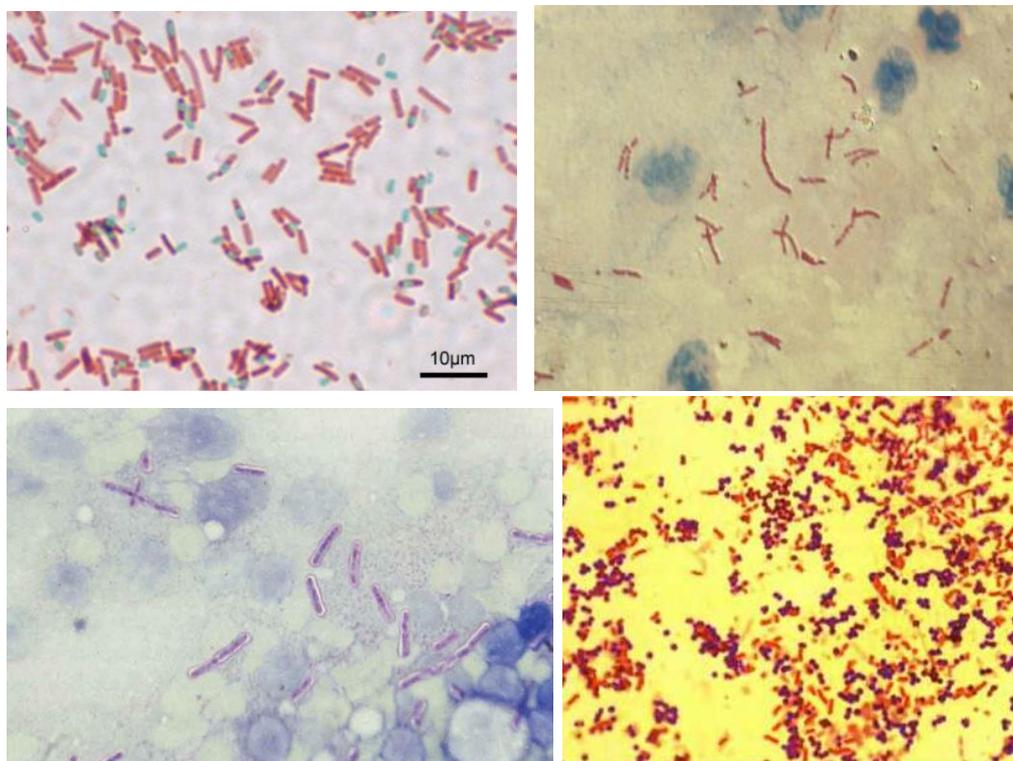


Рисунок 9 – микроорганизмы при разных способах окраски. 1 – окраска спор по Пешкову; 2 – окраска кислотоустойчивых бактерий по Циль-Нильсену; 3 – окраска капсул методом Михина; 4 – окраска бактерий по Граму.

Задание для самостоятельной работы:

1. Приготовить бактериоскопический препарат и окрасить его по Граму.
2. Провести микроскопию мазка, зарисовать в тетрадь.

Контрольные вопросы:

1. Описать особенность клеточной стенки у Гр (+) бактерий.
2. Рассказать о способах окраски некоторых структурных элементов микробной клетки.

ЗАНЯТИЕ №7

Изучение культуральных свойств микроорганизмов

Цель занятия: научиться описывать характер роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах.

Материалы и оборудование: чашки Петри и пробирки с колониями микроорганизмов.

Содержание занятия: Микроорганизмы, развиваясь на поверхности питательных сред, образуют характерные для данного вида колонии. Поэтому вид колоний – один из признаков, который необходим для идентификации исследуемого микроорганизма.

Описание колоний микробов на МПА:

1. Рост колоний: обильный, скудный, единичный.
2. Форма: округлая, амебовидная, неправильная, ризоидной (корневидная, напоминающая переплетающиеся корни деревьев).
3. Размер: точечные (диаметр колонии не более 1 мм), мелкие (диаметр 1-2 мм), средние (диаметр 2-4 мм) и крупные (диаметр 4-6 мм и более).
4. Оптические свойства: прозрачная, полупрозрачная (просвечивает), непрозрачная, блестящая, матовая, флуоресцирующая.
5. Цвет колонии: цвет колонии и среды, бесцветная.
6. Поверхность: матовая, блестящая, гладкая, шероховатая, складчатая, бугристая. Гладкие колонии обозначают буквой S (smooth - гладкий), шероховатые - буквой R (rough - шероховатый).
7. Профиль: плоский, выпуклый, кратерообразный, растающий в агар.
8. Край колонии: ровный, волнистый, лопастной, ризоидный
9. Структура: однородная, мелко- или крупнозернистая, струйчатая
10. Консистенция: маслянистая, тестообразная, вязкая, пленчатая
11. Запах среды: нет, есть, что напоминает.

Край и структуру колонии определяют при малом увеличении микроскопа, либо рассматривают под лупой. Консистенцию определяют путем взятия микробиологической петлей небольшого количества колонии.

Пример формы и краев колоний на рисунке 10.

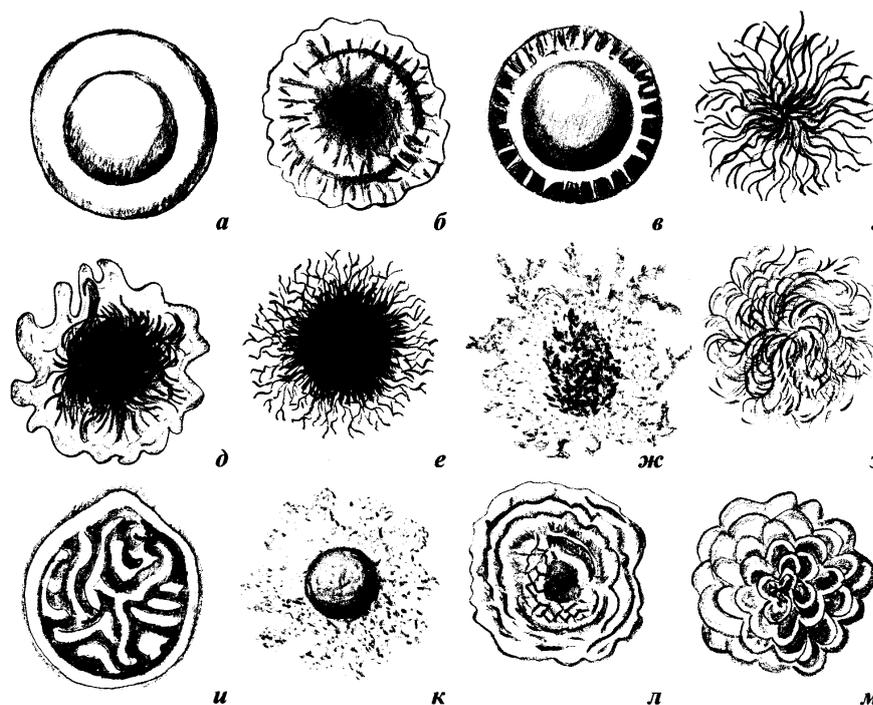


Рисунок 10 - формы и края колоний микроорганизмов. А – круглая, б – круглая с фасеточным краем, в – круглая с валиком по краю, г, д – ризоидная, е – круглая с ризоидным краем, ж – амёбовидная, з – нитчатая, и – складчатая, к – неправильная, л – концентрическая, м – сложная.

Описание колоний микробов на МПБ:

1. Интенсивность роста: скудная, умеренная или обильная.
2. Помутнение среды: помутнение среды, образование пленки или осадка.
3. Характер осадка: порошкообразный, зернистый, слизистый, в виде комочка ваты, легко разбивающийся при встряхивании, не разбивающийся при встряхивании.
4. Характер плёнки: пристеночное кольцо, сплошная плёнка на поверхности бульона (тонкая или толстая, плотная или рыхлая, гладкая или складчатая, сухая или слизистая).
5. Запах: нет, есть, что напоминает.

Рост микроорганизмов в МПБ и в жидких средах описывают, используя 4-7 суточные культуры, выращенные в стационарных условиях.

Описание колоний микробов на МПЖ по уколу:

1. Стержень: длинный, короткий, в виде плоской ленты и т.п.
2. Боковые отростки: длинные, короткие, в виде ёршика, ёлочки (прямой или перевёрнутой) и т.д.
3. Разжижение желатины: не разжижает, разжижает полностью, разжижает послойно, в виде воронки и т.д. (рис. 11)

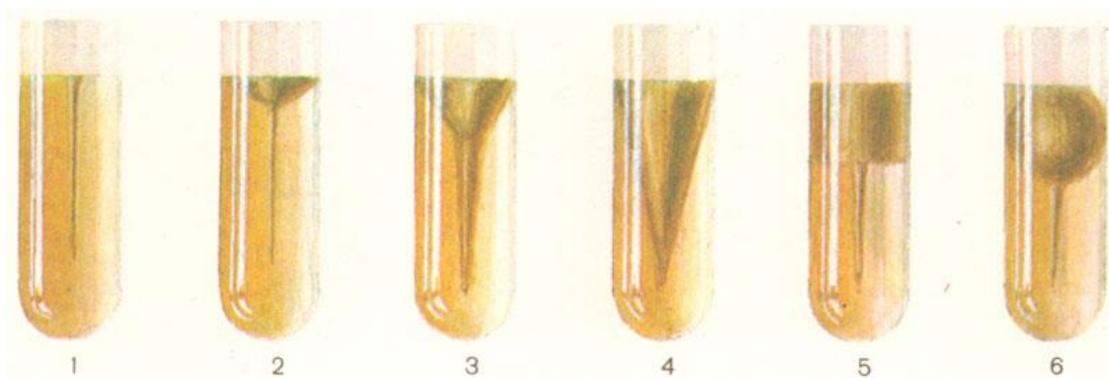


Рисунок 11 – разжижение желатины микроорганизмами. 1 – не разжижают, 2, – разжижают в виде воронки, 4 – в виде ёлочки, перевернутой вверх ногами; 5, 6- поверхностное разжижение.

После макроскопического изучения культуры из неё делают мазки, определяют морфологию микробов, их отношение к окраске (тинкториальные свойства). Одновременно изучают подвижность микроорганизмов методом висячей или раздавленной капли.

При необходимости проводят серологические исследования выделенной культуры, а также заражают лабораторных животных.

К концу исследования должны быть чёткие данные о морфологических, культуральных, биохимических, серологических свойствах и патогенности изучаемой культуры, на основании которых определяют вид микроорганизмов, используя для этой цели специальные таблицы и определители микробов Н.А.Красильникова, Р.А.Циона, Д.Берджи.

Задание для самостоятельной работы:

1. Изучить культуральные свойства микроорганизмов, выращенных на плотных и жидких питательных средах; зарисовать в тетради и записать.

Контрольные вопросы:

1. По каким характеристикам изучают колонии микробов?
2. Какие свойства определяют при росте микробов в МПА и МПБ?

ЗАНЯТИЕ №8

Изучение биохимических свойств микроорганизмов

Цель: ознакомить студентов с методами определения биохимической активности бактерий по способности их:

- а) сбраживать углеводы с образованием кислоты, газа или только кислоты;
- б) разлагать белковые продукты с образованием сероводорода, индола и других веществ;
- в) редуцировать краски.

Материалы и оборудование: культуры микроорганизмов, питательные среды (агар Эндо, среды Гисса, среда Левина, МПЖ), культуры в МПБ с индикаторными бумажками на индол, сероводород, аммиак, реактив Ковача на оксидазу, перекись водорода, биологические петли, иглы и шпатели.

Содержание занятия:

При определении вида бактерий, кроме изучения их формы, величины, подвижности, отношения к окраске по Граму, характера роста на питательных средах, большое значение имеет исследование их биохимических свойств.

Биохимические свойства – это способность бактерий при помощи ферментов расщеплять сложные органические соединения. Одни из микробов расщепляют белки, другие – углеводы, третьи вызывают окисление и восстановление различных субстратов. По результатам биохимического исследования делается заключение о родовой и видовой принадлежности выделенных микроорганизмов, опираясь на данные справочной литературы.

Изучение сахаролитических свойств микроорганизмов:

Под действием сахаролитических ферментов микробов (способностью разлагать углеводы) сахара расщепляются на альдегиды и кислоты. Конечными продуктами их расщепления являются углекислый газ и вода.

Сахаролитические свойства микроорганизмов изучают на питательных средах, в состав которых входят различные углеводы и индикатор. Разложение микробами того или иного углевода сопровождается цветной реакцией благодаря присутствию индикатора. Микробы разлагают углеводы с образованием кислоты и газа. Газ собирается в бродильной пробирке или по ходу бактериологической иглы в виде пузырьков; кислота, изменяя реакцию среды, вызывает изменений цвета.

В *средах Гисса* («цветной ряд») расщепление сахара до промежуточных продуктов (кислот) определяют по покраснению среды, до конечных продуктов (газов) – по накоплению пузырьков газа в специальных

газовичках, помещенных в среду. При отсутствии ферментации сахара рост микробов выражается в равномерном помутнении среды без изменения цвета.

На *среде Эндо* в результате расщепления лактозы, входящей в состав этой среды, происходит восстановление цвета индикатора основного фуксина, в результате чего выросшие колонии микробов окрашиваются в яркий малиновый цвет. Так растёт на среде эндо *E.coli*.

На *среде Левина*, бактерии, расщепляющие лактозу (*E.coli*) растут в виде синих или черных колоний; не расщепляющие лактозу (сальмонеллы) – прозрачных, бесцветных или розоватых колоний.

На *среде Плоскирева* лактозоположительные колонии окрашены в розовый цвет, лактозоотрицательные – прозрачные.

Протеолитические свойства микроорганизмов (способность их разлагать белковые вещества) определяют при высеве их на желатину. Свёрнутую сыворотку крови или молоко. Некоторые патогенные виды микробов с выраженной протеолитической активностью расщепляют белки до конечных продуктов – *индола, сероводорода, аммиака*. Индол и сероводород имеют наибольшее значение при определении вида микроорганизма.

МПЖ – под действием протеолитических ферментов происходит протеолиз желатины и среда разжижается (рис. 11).

Культивирование проводят при 22°C. При этом микробы с аэробным типом дыхания разжижают МПЖ сверху, факультативные – по линии укола чулком, анаэробы – на дне пробирки. Микробы со слабовыраженными протеолитическими свойствами в МПЖ образуют от линии посева едва заметные боковые отростки. При этом такой рост у аэробов характеризуют как «ёлочка верхушкой вниз», у факультативных анаэробов – рост в виде «щётки», а анаэробов – рост в виде «ёлочки верхушкой вверх». Микробы с отсутствием протеолитических ферментов растут в МПЖ, не изменяя её: аэробы – в виде кнопки на поверхности среды; анаэробы 0 на дне пробирки.

Для приготовления *молочной среды* берут сепарированное молоко, фильтруют через полотно. Слегка подщелачивают 10%-ным раствором углекислого натрия, разливают по пробиркам и стерилизуют дробно по 20 минут 3 дня.

Молоко, после посева микробов, под влиянием протеолитических ферментов пептонизируется, т.е. происходит просветление и растворение сгустка казеина, образующегося в первые часы роста микроорганизмов.

В случае высева микробов на свёрнутую сыворотку крови на её поверхности при протеолизе появляются углубления, а при длительном выращивании бактерий начинается её разложение.

Степень протеолиза и глубину расщепления белка у разных видов бактерий определяют по образованию конечных продуктов распада (идол, сероводород, аммиак).

Определение индола. Фильтровальную бумагу пропитывают горячим насыщенным (12%-ым) водным раствором щавелевой кислоты, высушивают на воздухе. Кусочек такой бумаги размером 10×0,5 см помещают над засеянным МПБ между ватно-марлевой пробкой и стенкой пробирки так, чтобы бумага не касалась бульона. Так выдерживают пробирку в термостате при 37°C 1-3 дня. При наличии индолообразования нижняя часть индикаторной бумажки окрасится в розовый цвет (просматривать при проходящем свете).

Определение аммиака. В пробирку с засеянной бактериальной культурой вкладывают (между ватно-марлевой пробкой и стенкой пробирки) розовую лакмусовую бумажку, которая в присутствии аммиака синееет.

Либо в фарфоровую чашку пипеткой вносят каплю бульонной культуры микробов и каплю реактива Несслера (смесь йодистого калия с химически чистой сулемой и 50%-ного раствора КОН). При наличии аммиака в зависимости от его количества культура с индикатором приобретает жёлтое или коричневое окрашивание.

Определение сероводорода. Полоску фильтровальной бумаги пропитывают 10%-ным раствором уксуснокислого свинца и помещают между пробкой и стенкой пробирки над засеянным бульоном. При наличии сероводорода бумага чернеет от образовавшегося сернистого свинца.

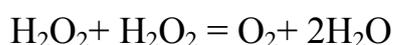
Изучение редуцирующих свойств микроорганизмов:

Редуцирующие свойства микробов определяют на основании изменения цвета органической краски (метиленовая синька, малахитовая зелень, нейтральрот и др.) внесённой в питательную среду (чаще в молоко). Петлю исследуемой культуры высевают в среду с краской и инкубируют в термостате 24 ч. Под действием микробных ферментов краситель восстанавливается, о чём свидетельствует обесцвечивание или изменение первоначальной окраски. При обильном доступе кислорода краска может вновь окисляться и приобрести прежний цвет.

Редукция нитратов (денитрификация) – способность микробов восстанавливать соли азотной кислоты (нитраты) в соли азотистой кислоты

(нитриты), а затем в аммиак и свободный азот. Редукцию нитратов определяют посевом на специальную среду: к МПБ добавляют 2% азотнокислого калия (калийная селитра), свободного от нитритов, затем высевают культуру исследуемых микробов и через 48-72 ч культивирования в термостате при 37-38°C добавляют 1 мл реактива, содержащего йодистый калий, и 10%-ный раствор H₂SO₄ в определённых пропорциях. При редукции нитратов в нитриты проявляется тёмно-синее окрашивание среды.

Определение каталазы (оксидоредуктазы). Некоторые виды микроорганизмов в процессе дыхания образуют перекись водорода, которая при участии фермента каталазы разлагается на воду и молекулярный кислород,



поэтому количество её в культуре не достигает высоких концентраций. Для определения каталазы на поверхность односуточной агаровой культуры наносят 1мл 1-3%-ного раствора перекиси водорода так, чтобы поверхность культуры была покрыта тонким слоем. При наличии каталазы отмечают выделение пузырьков отщеплённого кислорода. Например стафилококки и эшерихии имеют каталазу, а стрептококки не имеют каталазу (рис. 12).

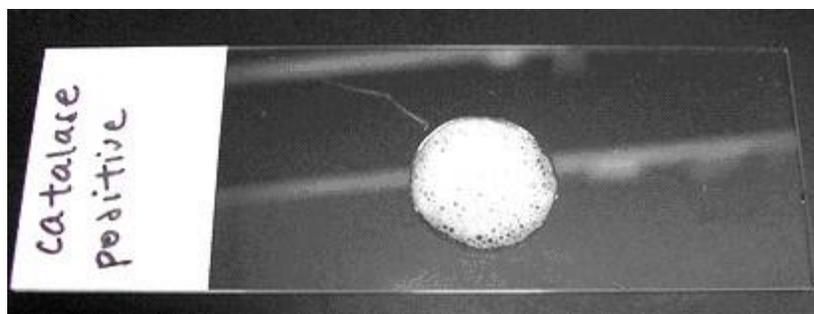


Рисунок 12 – Каталаза нейтрализует перекись водорода, как эндогенного происхождения, образующейся в результате аэробного окисления, так и экзогенного характера, вырабатываемой клетками иммунной системы хозяина, кроме того, каталаза участвует в окислительном фосфорилировании. Поскольку стафилококки и энтеробактерии продуцируют каталазу, перекись водорода, образующаяся как метаболит при аэробных условиях, для них не токсична.

Биохимические свойства бактерий можно начинать изучать одновременно с выделением культуры, засевая материал на специальные питательные среды, позволяющие судить о биохимической активности выделяемых микроорганизмов.

Наиболее показателен в этом отношении культуральный метод диагностики инфекций, вызываемых энтеробактериями: так как сотни входящих в это семейство видов

практически идентичны друг другу по морфологическим и культуральным свойствам, их биохимические свойства играют очень большую роль в процессе идентификации. Именно на этом примере мы и разберем данный вопрос.

А. На первом этапе патологический материал засевают на дифференциально-диагностические среды для кишечной группы бактерий. В состав этих сред, наряду с мясопептонным агаром, входит лактоза и индикатор. Если бактерия способна ферментировать лактозу (важный признак для дифференциации различных энтеробактерий), рН среды смещается в кислую сторону и индикатор окрашивает колонию в соответствующий цвет. В нашей стране наиболее распространены среды Эндо, Левина и Плоскирева.

Б. На II этапе отобранную для дальнейшей работы колонию засевают на среды накопления и первичной дифференциации. Эти среды содержат уже несколько субстратов, по отношению к которым определяется ферментативная активность изучаемой бактериальной культуры, кроме того, эти среды формируются в пробирки так, чтобы получился участок со столбиком и участок скошенного агара. Изучаемая колония засеивается в столбик уколом, а на скошенную часть среды – плотным штрихом.

1. Среда Рессела содержит глюкозу и лактозу.
а. Если культура ферментирует только глюкозу, не ферментируя лактозу, то изменится цвет только столбика, без изменения цвета скошенной части.
б. Если культура ферментирует и глюкозу и лактозу, то изменится цвет всей среды – и столбика и скошенной части.

2. Среда Клиглера содержит не только глюкозу и лактозу, но и ингредиенты, позволяющие определить наличие сероводорода.

а. Если культура ферментирует только глюкозу, не ферментируя лактозу, то изменится цвет только столбика, без изменения цвета скошенной части.
б. Если культура ферментирует и глюкозу и лактозу, то изменится цвет всей среды – и столбика и скошенной части.
в. Если культура продуцирует сероводород, место засева уколом чернеет.

3. Среда Олькеницкого.

а. Если культура ферментирует только глюкозу, не ферментируя лактозу, то изменится цвет только столбика, без изменения цвета скошенной части.
б. Если культура ферментирует и глюкозу и лактозу, то изменится цвет всей среды – и столбика и скошенной части.
в. Если культура продуцирует сероводород, место засева уколом почернеет.
г. Наличие уреазной активности определяется по покраснению среды.

В. На III этапе биохимические свойства выделенной культуры изучаются более детально.

1. Сахаролитические свойства изучаются на средах Гисса.

а. Наиболее информативны при дифференциации энтеробактерий пять углеводов: лактоза, глюкоза, манит, мальтоза и сахароза. Пять сред Гисса с этими углеводами называют коротким рядом Гисса (во всех бактериологических лабораториях стран СНГ они располагаются в штативе именно в таком порядке, в котором они здесь перечислены, что позволяет легче визуализировать результат анализа).

б. В случае необходимости определяют способность изучаемой культуры ферментировать и большее количество субстратов (моносахаридов, полисахаридов, спиртов). Тогда говорят о длинном ряде Гисса.

2. Протеолитические свойства бактериальной культуры определяют, засеивая ее на среды с белковыми субстратами (желатин, пептон и др.).

а. Желатин используется как показатель наличия или отсутствия у изучаемой бактериальной культуры протеолитической активности как таковой.

б. У микробов, обладающих протеолитической активностью, при утилизации белкового субстрата может образовываться (или не образовываться) индол.

в. У микробов, обладающих протеолитической активностью, при утилизации белкового субстрата может образовываться (или не образовываться) сероводород.

2. В ряде случаев для идентификации выделенной бактериальной культуры необходимо определить продуцирует ли она конкретные ферменты. Чаще всего выясняется наличие оксидазной и каталазной активностей.

Существуют биохимические пластины для изучения биохимических свойств микроорганизмов, позволяющие идентифицировать до 20 видов микроорганизмов. Например, пластина биохимическая, дифференцирующая энтеробактерий (ПБДЭ), выделенных в ходе бактериологического анализа, до вида по 20 биохимическим признакам. Представляет собой полимерную пластину с 12-24 лунками (в зависимости от вида пластины), содержащими высушенные среды с субстратами для 12-24 тестов: выявление уреазы, β -D-галактозидазы, лизиндекарбоксилазы, орнитиндекарбоксилазы, аргининдигидролазы; образования сероводорода, индола, ацетоина; ферментацию глюкозы, сахарозы, маннита, малоната, цитрата, цитрата натрия с глюкозой, инозитола, сорбитола, арабинозы, мальтозы (рис. 13).



Рисунок 13 - пластина биохимическая, дифференцирующая энтеробактерий. Снизу – биохимическая платина, справа – карточка учета результатов, по изменению цвета среды судят о положительной или отрицательной реакции.

Функциональное назначение

Биохимическая идентификации до вида 20 культур микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* в течение суток. Исследуемую колонию со среды первичного посева отсевают на скошенный МПА, микроскопируют при окраске по Граму отсевают в пробирки со средой Олькеницкого и полужидким МПА для исследования на подвижность. Чистую культуру бактерий со скошенного МПА суспензируют в

физиологическом растворе и вносят по 100 мкл суспензии во все лунки пластины, добавляют в соответствующие лунки вазелиновое масло. Пластины в пенале инкубируют при 35-37°C в течение 18-24 ч. Затем добавляют реактивы в соответствующие лунки и учитывают результаты. Результаты вносят в кодovou карточку. Идентификацию проводят по каталогу кодов.

Задание для самостоятельной работы:

1. Провести посев микроорганизмов на среды Гисса и оценить результаты;
2. Определить наличие индола, сероводорода, каталазной активности у исследуемых культур.

Контрольные вопросы:

1. Как определить протеолитические свойства микробов?
2. Как определить сахаролитические свойства микробов?
3. Как определяют окислительно-восстановительные ферменты?

ЗАНЯТИЕ №9

Методы стерилизации

Цель занятия: ознакомить студентов с целями, методами и задачами стерилизации; ознакомиться с принципами и режимами работы основной микробиологической аппаратуры (автоклавом, аппаратом Коха, сушильным шкафом, бактериальными фильтрами и др.)

Материалы и оборудование: автоклав, аппарат Коха, сушильный шкаф Пастера, фильтры Зейтца, Шамберлана, крафт-бумага и др.

Содержание занятия:

Одно из основных условий работы в лаборатории – отсутствие на инструментах, посуде, питательных средах микроорганизмов, уничтожение которых достигается стерилизацией (обеззараживанием).

Методы стерилизации разнообразны. Выбор их зависит прежде всего от свойств стерилизуемого объекта. В практике наибольшее применение нашли следующие методы стерилизации:

1. **Стерилизация прокаливанием на огне**, или фламбирование, имеет ограниченное применение, т.к. большинство предметов от прокалывания портится. Фламбированием стерилизуют бактериальные петли, пинцеты, предметные стёкла и др.

2. **Стерилизация кипячением** проводится в специальных стерилизаторах, куда заливают дистиллированную воду, добавляют 1% соды или 0,5% карболовой кислоты. При отсутствии дистиллированной воды можно использовать кипяченую водопроводную воду. На дно стерилизатора кладут ровным слоем марлю или вату, на которой раскладывают шприцы, иглы, ножницы, скальпели, предметные стёкла, ч.Петри, пробирки и др. В зависимости от степени загрязнения инструментов, стерилизация длится от 10 до 40 минут.

3. **Стерилизация сухим жаром** используется для обеззараживания лабораторной и аптечной посуды. Её проводят в сушильных шкафах (печах Пастера). Сушильный шкаф представляет собой двустенный металлический шкаф, покрытый снаружи слоем асбеста, в котором осуществляется нагрев воздуха. Продолжительность стерилизации зависит от температуры. Чем она выше, тем короче продолжительность стерилизации. Так, при 140°C материал стерилизуют в течение 2 ч, при 170°C – 45 мин. После стерилизации шкаф открывают только после того, как он достаточно остыл, иначе стеклянная посуда может потрескаться.

4. **Стерилизация текущим паром в аппарате Коха.**

Аппарат Коха представляет собой одностенный металлический цилиндр, покрытый снаружи линолеумом или асбестом. Аппарат закрывают конусообразной крышкой, в которой имеются отверстия для выхода пара и термометра.

Перед стерилизацией в цилиндр наливают воду, об уровне которой судят по показанию водомерной трубки. На подставку ставят металлические ведёрки с отверстиями, в которые помещают стерилизационный материал. При кипячении пар непрерывной струёй выходит через отверстие в крышке, при этом температура в аппарате достигает 100°C.

Текущим паром стерилизуют питательные среды, состав которых изменяется под действием температуры выше 100°C (среды с сахарами). Стерилизацию проводят дробно, сущность её заключается в следующем. В 1-ый день стерилизуют 30 мин, при этом погибают вегетативные формы, споры же сохраняются. Ко второму дню большинство спор прорастает. На второй день стерилизацию проводят в течение 20 мин, при этом погибают вегетативные клетки, образовавшиеся в результате прорастания спор. Прорастают ранее не проросшие споры. На третий день материал стерилизуют 20 мин, при этом погибают оставшиеся вегетативные формы. В

промежутках между стерилизацией среды оставляют в помещении при комнатной температуре 37°C. Таким путём достигается стерилизация не только аспорогенного, но и спорового материала.

5. Тиндализация (предложена Тиндалем). Если объекты, подлежащие стерилизации, не выдерживают температуры 100°C, то в этих случаях можно воспользоваться методом дробной стерилизации с прогреванием материала в течение 1 ч при $t=60-65^{\circ}\text{C}$ пять дней или при $t=70-80^{\circ}\text{C}$ – три дня. Тиндализацию проводят в водяной бане или специальном аппарате с терморегулятором. В первый день прогревание проводят в течение двух часов.

6. Стерилизация насыщенным паром под давлением в автоклаве

Автоклав представляет собой двустенный металлический котёл с герметически закрывающейся крышкой, завинчивающейся винтами. Он снабжен манометром, краном для выпуска пара, предохранительным клапаном и водомерным стеклом. Перед стерилизацией в автоклав наливают воду. Поместив в автоклав материалы (питательные среды, отработанные культуры, патологический материал, инструменты и лабораторную посуду и т.д.), подлежащие стерилизации, плотно завинчивают крышку, оставляя кран открытым. Автоклав включают в сеть. Когда вода в автоклаве закипит. То из крана начинает выходить пар вместе с воздухом, находившимся в автоклаве. Необходимо, чтобы весь воздух из автоклава был вытеснен, так как в противном случае показания манометра не будут соответствовать температуре в автоклаве. Появление сильной непрерывной струи пара указывает на полное удаление воздуха из автоклава, после чего следует закрыть кран. Через некоторое время стрелка манометра, соединенного с автоклавом, начнёт поднимать вверх. Началом стерилизации считается время, когда стрелка манометра достигнет необходимого давления.

Стерилизацию в автоклаве, в зависимости от давления и материала, проводят в течение 30-120 мин. С повышением давления температура возрастает. При давлении в одну атмосферу температура достигает 121°C, в полторы атмосферы - 127°C, в две атмосферы - 134°C и т.д. При такой температуре погибают не только вегетативные формы микробов, но и споры.

По окончании стерилизации подогрев отключают и дают давлению самопроизвольно снизиться, после чего открывают кран и выпускают пар из автоклава. Если открыть крышку автоклава раньше, чем стрелка манометра опустится до нуля, то стерилизуемые жидкости, нагретые выше 100°C, закипят и могут смочить и даже вытолкнуть ватные пробки.

Автоклав с незавинченными краном и крышкой, может быть использован для дробной стерилизации текучим паром.

7. Стерилизация фильтрованием через мелкопористые фильтры (бактериальные фильтры)

Для стерилизации жидкостей, портящихся при нагревании, пользуются фильтрованием через бактериальные фильтры (механическая стерилизация). Фильтрацией через специальные приборы освобождается жидкость от бактерий. Этим же способом пользуются для получения возбудителей вирусных болезней в чистом виде, ибо они в отличие от бактерий проходят через бактериальный фильтр. Для этой цели используют специальные свечи или асбестовые фильтры. Свечи изготавливают из глины (керамические) и других материалов. Они имеют различную пористость и соответственно этому различные цифровые и буквенные обозначения. К пористым фильтрам относят свечи Шамберлана, Беркельфельда, асбестовые – фильтры Зейтца (рис. 14). Последние закрепляются между специальными металлическими пластинками.

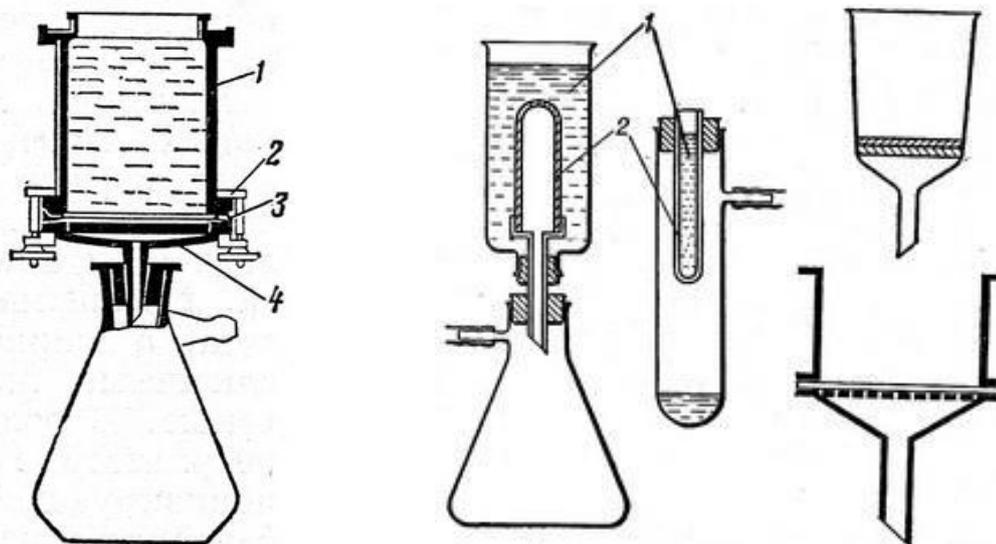
Фильтрация жидкостей производится под повышенным или пониженным давлением. В первом случае через смонтированный фильтровальный прибор пропускают жидкость под давлением, во втором – в сосуде, куда должна поступать фильтровальная жидкость, создаётся разрежение воздуха (отрицательное давление). Повышенное и пониженное давление создаётся с помощью насосов. Перед фильтрацией приборы (свечи, асбестовые фильтры) в смонтированном виде стерилизуют. После работы, бывшие в употреблении свечи стерилизуют, асбестовые фильтры уничтожают.

8. Пастеризация

Некоторые питательные среды изменяются под действием высоких температур. Их частично можно обеззараживать методом пастеризации, который предложил Л.Пастер. Пастеризацию проводят при 70-90°C. При температуре 70°C материал нагревают в течение 30 мин, при температуре 90°C-15 мин.

В связи с тем, что при пастеризации температура невысокая, то погибают только вегетативные формы микробов, спорообразующие микробы и споры сохраняются. Пастеризация поэтому используется для отделения споровых культур или спор от вегетативных форм микробов. После нагревания материала остаются споры, при высеве которых можно получить спорообразующую культуру микробов.

Чаще всего пастеризацию применяют в хозяйствах для обеззараживания молока, полученного от животных. Больных туберкулезом, бруцеллезом и др. Продукты при этом равномерно нагревают по всей толщине, что достигается его перемешиванием.



А)

Б).

Рисунок 14 – А - фильтр Зейтца: 1 – стерилизуемая жидкость, 2 – винты, 3 – фильтр Зейтца, 4 - специальные металлические пластины для фильтра Зейтца; Б - свеча Шамберлана стеклянные фильтры с пластинками из мелкопористого стекла (2); 1 – стерилизуемая жидкость.

9. Ультростерилизация

Это нагревание продукта до 150°C в течение одной секунды. Проводится она в трубчатых аппаратах путём введения в них химически чистого пара.

Ультростерилизация используется для обеззараживания молока, при этом устраняются окислительные процессы, приводящие к разрушению витамина С, и удаляются некоторые летучие вещества кормового и стойлового происхождения. Такое молоко сохраняет свои свойства длительное время.

10. Стерилизация ультрафиолетовыми лучами.

Ультрафиолетовые лучи обладают бактерицидным действием. Наибольшее воздействие на бактерии оказывают лучи с длиной волны от 200 до 295 мкм, в связи с чем данная область ультрафиолетовых лучей называется бактерицидной. Максимум бактерицидного действия располагается около длины волны 260 мкм. В настоящее время ультрафиолетовые лучи широко используются в различных отраслях народного хозяйства для обеззараживания воздуха помещений, воды и

различных предметов. В операционных залах ультрафиолетовые лучи применяют для санации воздуха. Для стерилизации инъекционных жидкостей ультрафиолетовые лучи не используют, так как через обычное стекло практически не проходит бактерицидная часть ультрафиолетовых лучей. Кроме того, с увеличением толщины слоя жидкости бактерицидные свойства ультрафиолетовых лучей резко снижаются.

При работе с бактерицидными лампами необходимо соблюдать технику безопасности, так как ультрафиолетовые лучи действуют на глаза и могут вызывать ожоги. Для удаления выделяющегося в воздух озона в помещениях должна быть хорошая вентиляция.

Задание для самостоятельной работы:

1. Ознакомиться с устройством аппарата Коха, автоклава, фильтров, печи Пастера.

Контрольные вопросы:

1. Что такое стерилизация? Какие методы стерилизации применяют в лаборатории?
2. Что такое автоклавирование? Для чего его применяют?
3. В чём суть дробного метода стерилизации?

ЗАНЯТИЕ №10

Морфология плесневых грибов

Цель занятия: Провести микроскопическое исследование, изучить морфологию некоторых представителей плесневых грибов.

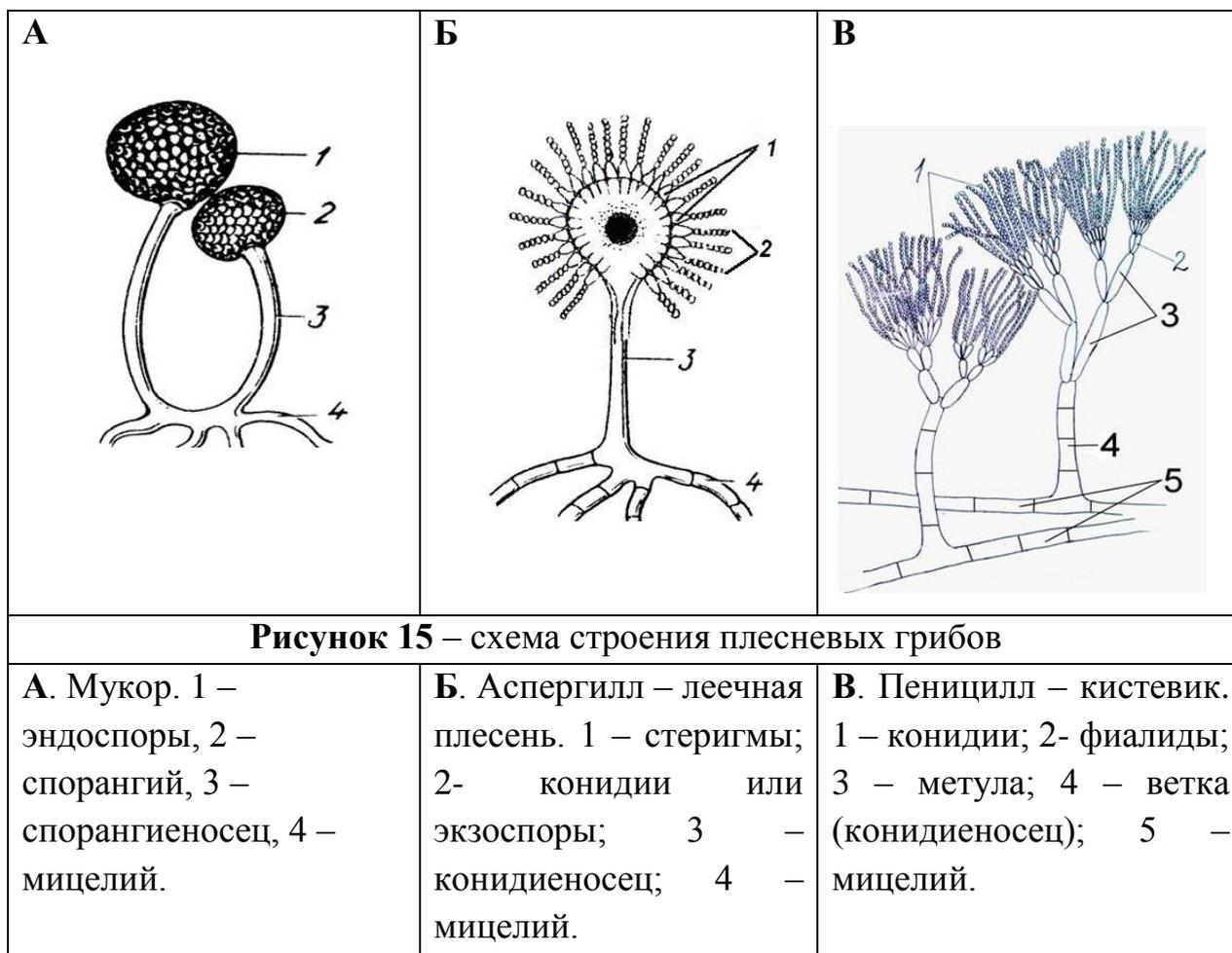
Материалы и оборудование: плесневые грибы на продуктах питания, чашки Петри и пробирки с односуточной культурой мукора и двухсуточными культурами пеницилла и аспергилла. Изотонический раствор натрия хлорида. Микробиологические петли и иглы, спиртовки, предметные и покровные стёкла, микроскопы.

Содержание занятия: Плесневые грибы (*Fungi*) – это бесхлорофильные микроорганизмы, растут на поверхности различных субстратов, имеют хорошо оформленное ядро, поэтому их относят к эукариотам (рис. 15). Большинство из них нуждается в кислороде воздуха.

Легко переносят низкие температуры, поэтому могут жить и размножаться в холодильных камерах.

Среди грибов различают как сапрофиты, так и паразиты. Все грибы делят на высшие и низшие и относят к шести классам.

Хитридиевые (Chitridiomycetes), оомицеты (Oomycetes), зигомицеты (Zygomycetes) относят к низшим грибам; аскомицеты (Ascomycetes), базидиомицеты (Basidiomycetes) и дейтеромицеты, несовершенные грибы (Deuteromycetes, Fungi imperfecti) – к высшим.



Грибы не имеют хлорофилла, поэтому они используют для своего питания углерод только из готовых органических соединениях и по типу питания их относят к гетеротрофам.

Все грибы, кроме некоторых высших (дрожжи) и примитивных низших имеют вегетативное тело – мицелий (или грибницу) – состоящую из тонких ветвящихся нитей, называемых *гифами*. Мицелий может быть погружным (субстратным) и воздушным (надсубстратным). У низших грибов он одноклеточный, у высших – многоклеточный. В толще мицелия имеются перегородки – септы, разделяющие его на отдельные одноядерные или многоядерные клетки - гифы. Септы перфорированы, что обеспечивает

сообщение между клетками и таким образом создаёт замкнутую систему, состоящую из гиф (трубочек), заполненных цитоплазмой и множеством ядер. Иногда мицелий грибов образует ризоиды – корешкообразные выросты, при помощи которых грибы крепятся к субстрату и получают питательные вещества.

Склероции – сплетения гиф округлой или продолговатой формы. Они имеют большие размеры, уплотнены, устойчивы к неблагоприятным воздействиям среды, содержат много питательных веществ, необходимых в период нахождения гриба в неблагоприятных условиях и мало воды. У некоторых грибов склероции представляют почкующуюся стадию мицелия.

Многие грибы образуют хламидоспоры – разрастания мицелия с утолщенной оболочкой, внутри которых содержатся питательные вещества. Они могут быть одно- и многоклеточными и служат для сохранения вида, так как хорошо переносят неблагоприятные условия среды.

От вегетативного тела отходит плодоносящее тело – спорангиеносец или конидиеносец.

У мукора (класс зигомицеты, семейство Mucoraceae) от одноклеточного мицелия отходят одноклеточные спорангиеносцы, которые заканчиваются шаровидным утолщением – спорангием. Внутри него находятся эндоспоры. При разрыве спорангия споры выходят во внешнюю среду и, попадая в благоприятные условия, дают начало новой плесени (рис. 15, А).

Род аспергилл, или леечная плесень имеют септированный мицелий. От мицелия отходит одноклеточный конидиеносец с утолщением на конце. На головке конидиеносца веерообразно расположены короткие верхушечные клетки - стеригмы, напоминающие шипы, от которых отшнуровываются конидии, или экзоспоры. Конидии расположены радиально и напоминают струйки воды, выходящей из лейки, отсюда и второе название гриба (рис. 15, Б).

Род пеницилл, или кистевик имеют многоклеточный мицелий и множественные конидиеносцы (рис. 15, В). В верхней части плодоносящее тело разветвлено в виде кисти, откуда и второе название плесени. Последние сегменты кисти – фиалиды – заканчиваются конидиями, или экзоспорами. Пеницилловых грибов в природе много. Они составляют около половины всех плесневых грибов.

Рост на сусло-агаре

Оптимальные температурные условия почти для всех грибов – 25-37°C, а для токсиногенных грибов, поражающих корма, - 20-25°C. Влажность субстрата должна быть 25% и выше. Относительная влажность воздуха для интенсивного развития грибов обычно достигает 90-100%. Кардинальными точками рН является 3-10; благоприятными для большинства грибов – среды с рН 6,0-6,5.

Мукор - представитель класса *Zygomycetes* - растёт в виде пушистого серого налёта. Рост появляется в течение первых суток. Аспергилл (леечная плесень) - представитель класса *Deuteromycetes* - растёт более медленно. Рост появляется на вторые сутки. Конидии могут быть окрашены в жёлтый цвет (*Asp. flavus*), жёлто-зелёный (*Asp. fumigatus*), зелёный (*Asp. oryzae*), чёрный (*Asp. niger*). Пеницилл (кистевик) - представитель класса *Deuteromycetes* - растёт в виде пушка серо-зелёного или серо-голубого цвета, или ярко - зеленого с белым ободком по периферии. Хорошо выраженные кисточки появляются на 2-3 сутки.

Приготовление препарата: препараты плесневых грибов готовятся методом раздавленная капля. Для того, чтобы было наименьшее повреждение и заламывание структур гриба, вместо физ.раствора лучше использовать каплю КОН или NaOH.

Препарат мукора готовят из односуточной культуры. Для исследования берут серые головки. Рассматривают под малым увеличением (×8).

Препарат аспергилла готовят из 2-3 суточной культуры. У аспергилла с серыми, но не чёрными конидиями бывают хорошо видны стеригмы в виде лепестков у подсолнуха. Расширение конидиеносца вначале находят под малым увеличением, затем более детально рассматривают под средним.

Препарат пеницилла готовят из 2-3 суточной культуры. Для исследования берут материал на границе серо-зелёного и белого по периферии колонии. Рассматривают под средним увеличением (×40), можно использовать иммерсионное масло.

Необходимо помнить, что плесневые грибы размножаются спорами. Поэтому препарат надо готовить вблизи предметного стекла, не допуская рассеивания спор. Микробиологические иглы по окончании работы тщательно фламбируют над пламенем спиртовки.

Фузариум (несовершенные грибы). Мицелий белый, розовый или жёлтый (рис. 16). От него отходят короткие ветвящиеся конидиеносцы, на концах которых располагаются конидии. Они могут быть серповидные (рис. 17) с несколькими перегородками (макроконидии) и овальные

(микроконидии), чаще без перегородок. Хламидоспоры бывают шаровидные, грушевидные, располагаются скоплениями или цепочкой. Образуются в старых конидиеносцах, строме, конидиях. Воздушный мицелий хорошо развит.



Рисунок 16 – фузариум, рост на питательной среде.



Рисунок 17 – фузариум. Макроконидии. Об. 40, ок. 15. Оригинал.

Фузариумы широко распространены в природе. Многие из них вызывают порчу плодов, овощей, поражают всходы растений. У поражённых растений листья пожелтевшие, на их поверхности серовато – розовый налёт. Фузариумы, особенно при низких температурах, образуют токсины (зеараленон, Т-2 микотоксин и др). При поедании животными и птицей поражённых растений и зерна наступает отравление. Клинически это проявляется угнетением, нарушением координации движения и другими признаками. Микотоксин зеараленон вызывает у свиней эстрогенизм, дегенеративные изменения яичников, матки, что приводит к бесплодию. Т-2 микотоксин поражает желудочно-кишечный тракт, сердечно-сосудистую, нервную системы, а также костный мозг, лимфатические узлы и другие органы и ткани.

Альтернария.

Альтернории широко представлены в природе. Многие из них – сапрофиты и развиваются на любых органических субстратах. Резервуаром для альтернорий являются отмирающие растения и растительные остатки, с которых гриб попадает в почву.

У грибов этого рода многоклеточные темноокрашенные конидии с поперечными и продольными перегородками. Форма конидий разнообразна и представляет собой вариации формы яйцевидного типа. Верхний конец конидии вытянут в короткий или длинный «носик». У многих альтернорий конидии образуют легко распадающиеся цепочки (рис.18, 19). Однако среди альтернорий есть представители с одиночно сидящими конидиями, у которых «носик» обычно вытянут в длинную нить. Конидиеносцы всегда темноокрашенные, простые или у вершины ступенчато-изогнутые.

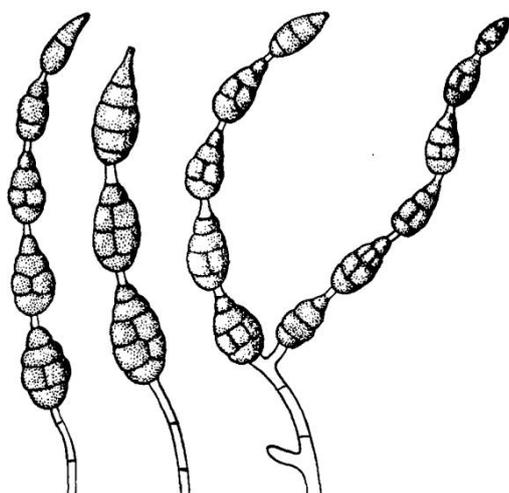


Рисунок 18 – альтернория.
Конидиеносец с конидиями



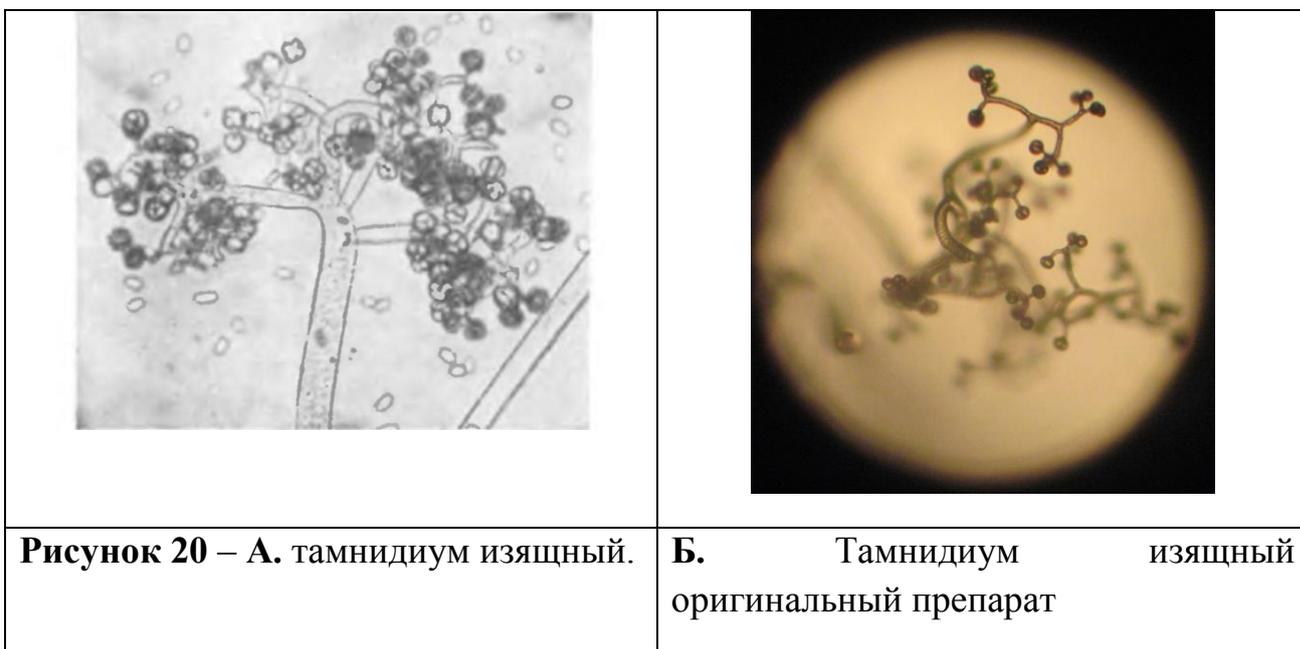
Рисунок 19 – альтернория.
Оригинальный препарат. Об.40.
ок.15.

Тамнидиум.

Род тамнидиум (*Thamnidium*) объединяет 4 вида, характеризующиеся дихотомически разветвленными спорангиеносцами с верхушечными спорангиями. Близким к нему является род геликостилум (*Helicostylum*). Для представителей этого рода характерны боковые спорангии и стерильные стилоспорангиеносцах, которые обычно хорошо разветвлены (рис. 20).

Грибы обоих родов встречаются чаще в почве и на экскрементах травоядных животных. Отдельные их представители хорошо развиваются при низких температурах и вызывают плесневение мяса и мясных продуктов

при хранении в холодильниках. Например, тамнидиум изящный (*T. elegans*) и геликостилум прекрасный (*H. pulchrum*).



На поверхности любого растения всегда имеется многочисленная грибная и микробная флора. Однако если зерно или растение не повреждено и здоровое, то имеющаяся микрофлора не причиняет им вреда

Задание для самостоятельной работы:

1. Приготовить препараты методом раздавленная капля из культур плесневых грибов. Провести микроскопию. Зарисовать в тетрадь.

Контрольные вопросы:

1. Морфология мукора. Как правильно готовить препарат из мукора?
2. Морфология аспергилла и пеницилла.
3. Морфология фузариумов и альтернрии, тамнидиума.
4. Приготовление препаратов плесневых грибов.

ЗАНЯТИЕ №11

Актиномицеты. Морфология дрожжей

Цель занятия: провести микроскопию и зарисовать препарат, приготовленный из культуры актиномицетов. Приготовить придавленную каплю из культуры дрожжей. Изучить строение и зарисовать дрожжевые клетки.

Материалы и оборудование: дрожжи прессованные, сахар, вода, предметные стёкла, покровные стёкла, микробиологические петли, микроскопы, спиртовки, питательная среда с культурой актиномицетов.

Содержание:

Актиномицеты (от греч. *actis* – луч, *mykes* – гриб). Под таким названием объединена большая группа одноклеточных микроорганизмов, имеющих тенденцию к ветвлению. Актиномицеты несмотря на нитевидное строение, относятся к бактериям. Актиномицеты имеют прокариотический тип клетки. У них отсутствует ядерная мембрана. Диаметр гиф не превышает толщину микробной клетки (0,5-2,0 мкм), их рассматривают под иммерсионной системой микроскопа.

Среди актиномицетов различают как сапрофитные формы, так и паразиты. В патологическом материале (гное) можно обнаружить радиально расположенные лучи – друзы, которые по Граму окрашиваются неравномерно: центральная часть – тёмно-фиолетовая, периферическая – красная или розовая. Актиномицеты-сапрофиты принимают активное участие в почвообразовательных процессах.

На агаризированных средах актиномицеты образуют округлые с плотным центром колонии, которые прочно соединяются с субстратом (рис. 21). Они могут быть окрашены в красный, бурый, розовый, зелёный и др. Мицелий субстратный и воздушный. Вначале образуется субстратный мицелий, а затем воздушный, придающий колонии бархатистый вид. От мицелия отходят спорангиеносцы со спорами на концах (органы плодоношения). Актиномицеты аэробы, растут на МПА при 30-35°C.

Приготовление препарата. Культуру, выращенную на плотной питательной среде, извлекают препаровальной иглой или упругой петлёй, наносят на предметное стекло и накрывают вторым таким же стеклом. Придавливают, стёкла разъединяют вдоль поверхности, в результате чего получается два мазка. Культуру, выращенную на жидкой питательной среде, наносят на предметное стекло петлёй. Фиксированный мазок окрашивают фуксином Пфейффера.



Рисунок 21 – колонии актиномицетов на плотной питательной среде (слева), микроскопическая картина препарата актиномицета (справа).

Микроскопическая картина: тонкие разветвленные нити (гифы), расположенные пучками или тяжами (рис. 21).

Дрожжи.

Дрожжи – представители класса *Ascomycetes* - безмицелиальные одноклеточные почкующиеся микроорганизмы округлой, овальной или грушевидной формы (рис. 22).

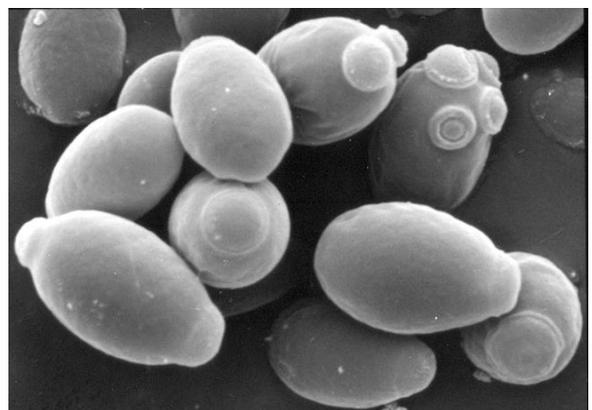
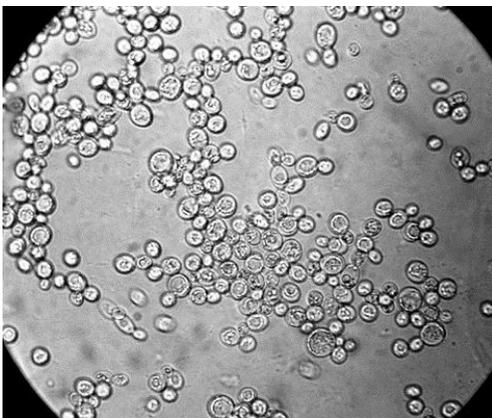


Рисунок 22 – дрожжевые клетки. Об. 40. ок.15.

Рисунок 23 – дочерние шрамы на поверхности материнской клетки (видны округлые выпячивания с ободком по периферии)

Дрожжи сапрофиты используют в бродильной промышленности; паразиты вызывают болезни животных – бластомикозы.

Клетки дрожжей имеют оболочку, цитоплазму и, в отличие от прокариотов, оформленное ядро, которое хорошо видно в неокрашенном препарате. Цитоплазма молодых клеток более однородная, с возрастом появляются вакуоли. Дрожжи крупнее бактериальных клеток, их диаметр составляет 10-15 мкм. Внутри клеток дрожжей образуются споры, после чего они становятся асками (сумками). Количество спор колеблется от 4 до 12. Также различают артроспоры – покоящиеся клетки дрожжей. Они отличаются от вегетативных форм наличием двухконтурной оболочки, не содержат вакуоли, содержат большое количество питательных веществ (гликоген, жир). Размножение дрожжей происходит почкованием, спорами и половым путём (копуляцией). Как видно (рис. 23), на поверхности материнской клетки после отделения почки остаётся дочерний шрам, который состоит из хитина и представляет собой округлое выпячивание с приподнятым ободком по периферии.

Приготовление препарата: 50 гр хлебопекарных прессованных дрожжей разводят в 500 мл подсахаренной теплой воды и оставляют в термостате при $t=30^{\circ}-35^{\circ}\text{C}$ на 1 час. Далее препарат рассматривают методом раздавленная капля. Клетки дрожжей видны и на малом увеличении, но для сравнения их размеров с другими микроорганизмами препарат лучше рассматривать под иммерсионной системой.

Микроскопическая картина: в поле зрения микроскопа видны округлые и вытянутые клетки, среди которых встречаются и почкующиеся.

Задание для самостоятельной работы:

1. Приготовить препараты методом раздавленная капля из культур актиномицетов и дрожжей. Провести микроскопию. Зарисовать в тетрадь.

Контрольные вопросы:

1. Морфология актиномицетов.
2. Как готовится препарат для микроскопии из актиномицетов?
3. Каково морфологическое строение дрожжей?

ЗАНЯТИЕ №12

Микробиологическое исследование почвы, воды, воздуха.

Цель занятия: ознакомить студентов с правилами взятия и пересылки проб почвы, воды и воздуха для бактериологического исследования. Научить

студентов наиболее распространенным методам количественного и качественного исследования почвы, воды и воздуха и их санитарной оценки.

Материалы и оборудование: колбы с почвой и стерильной водопроводной водой, мерные пипетки, пробирки, чашки Петри с МПА и др., прибор Кротова, термостат.

Содержание:

Исследование почвы: Бактериологическое исследование почвы проводят с целью обнаружения в ней патогенных микробов: спор сибирской язвы, столбняка и др. Для исследования поверхностного слоя почвы, выкапывают ямку нужной глубины, обожженным шпателем или ножом удаляют верхний слой и обожженной ложкой набирают 200-300 г почвы. Пробу помещают в стерильную банку и плотно закрывают. Лучше брать несколько образцов почвы на разных участках исследуемой территории и, смешав их, получить среднюю пробу. На обследуемой территории до 1000 м³ выделяют два участка по 25 м² каждый: один участок выбирают вблизи, другой вдали от источника загрязнения. С каждого участка отбирают среднюю пробу, составленную из 5 образцов, взятых по диагонали. Если исследуют глубокие слои почвы, то для взятия пробы пользуются почвенными бурами.

30 г исследуемой почвы растирают в стерильной ступке и помещают в колбу с 270 мл стерильной воды (в условиях учебной лаборатории 1 г почвы вносят в 10 мл воды). Колбу встряхивают в течение 10 минут и дают жидкости отстояться, а затем производят посев на питательные среды и заражение лабораторных животных.

Из полученного разведения почвы 1:10¹ готовят последующие десяти кратные разведения: для чистых почв до 1:10⁴, для загрязненных до 1:10⁶-1:10⁹.

Из двух последних разведений почвы берут по 1мл и переносят в стерильные чашки Петри (не менее двух чашек на каждое разведение), которые заливают 15 мл охлажденного до 50°C МПА и тщательно перемешивают (метод горячих заливок). Посевы культивируют в термостате 24-48 ч при 30°C.

Учет результатов проводят путем подсчета выросших колоний в чашках Петри и определения среднеарифметического значения. Полученное число колоний умножают на степень разведения исследуемой почвы и получают число бактерий в 1 г почвы. Обычно в 1 г огородной почвы количество бактерий достигает 1-3 млрд.

Если почву исследуют на присутствие споровых бактерий, то полученную взвесь прогревают при t=80°C в течение 30 мин для уничтожения вегетативных форм, а затем производят с ней дальнейшую работу.

Исследование воды: Для оценки качества воды производят санитарно-бактериологические исследования, которые складываются из определения степени обсеменённости (микробное число), и обнаружения санитарно-

показательных микроорганизмов (определение коли-титра и коли-индекса). В отдельных случаях воду исследуют на наличие патогенных микробов.

Коли-индекс - число особей кишечной палочки, обнаруживаемое в 1 л (для твердых тел в 1 кг) исследуемого объекта; определяется путем подсчета колоний кишечной палочки, выросших на плотной питательной среде при посеве определенного количества исследуемого материала, с последующим пересчетом на 1 л (кг).

Коли-титр - это наименьшее количество исследуемого материала, в котором обнаружена одна кишечная палочка. Для определения коли-титра отдельно засевают на жидкие среды десятикратно уменьшающиеся объемы исследуемого материала (например, 100; 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001 мл).

Для перевода коли-титра в коли-индекс следует 1000 разделить на число, выражающее коли-титр; для перевода коли-индекса в коли-титр 1000 разделить на число, выражающее коли-индекс.

Воду для исследования берут в стерильную посуду с соблюдением асептики в объеме 400-500 мл.

При взятии пробы воды из крана водопровода её спускают в течение 10-15 минут (чтобы в качестве пробы не попала вода, застоявшаяся в трубах водопроводной сети), после чего пламенем спиртовки обжигают кран, а затем набирают пробу в чистую стерильную колбу.

Для исследования воды открытых водоёмов необходимо соблюдать следующие правила:

1. Если имеется источник загрязнения, то из таких водоёмов берут три пробы воды – выше источника загрязнения, против него и ниже по течению;
2. Пробы воды из колодцев берут дважды: утром, до начала разбора воды, и вечером, после разбора;
3. Из рек, озёр и прудов воду берут на глубине 0,1-1,0 метра от поверхности и на расстоянии 1-2 метра от берега.

Воду берут специальным прибором (батометром), который опускают на определённую глубину. Там, на глубине, прибор открывается и в него набирается вода, после чего прибор доставляют на поверхность.

Для анализа необходимо взять 2 и более литров воды. Пробы берут в стеклянные бутылки с притёртыми пробками. К каждой из них прилагают сопроводительную ведомость, в которой отмечают:

- место взятия пробы;
- температуру воздуха, сведения об осадках в день взятия пробы и за последние 10 дней;
- температуру воды при отборе пробы;
- краткое описание водоёма;
- для какой цели направляется проба;

-должность и место службы лица, взявшего пробу и его подпись.

Определение общей бактериальной загрязненности воды:

Общая микробная обсемененность определяется количеством микроорганизмов в 1 мл воды.

Коли-титр и коли-индекс определяют двумя методами:

- метод бродильных проб;
- метод мембранных фильтров.

При исследовании чистой воды удобнее пользоваться методом мембранных фильтров; при исследовании воды, содержащей механические частицы, затрудняющие процесс фильтрации, лучше пользоваться бродильным методом.

Метод бродильных проб. Суть метода заключается в посеве определенных объемов исследуемой воды в среды накопления с индикатором и поплавками, инкубации ее при 37⁰С, с последующим пересевом из забродивших пробирок на среду Эндо, дифференциации выросших колоний и вычисление коли-титра воды по нормативам.

Этот метод основан на ферментативной способности БГКП расщеплять при помощи ферментов лактозу или глюкозы до кислоты и газа. Исследуемая вода засеивается в различных объемах в глюкозопептонную среду (ГПС) с индикатором и поплавками, при наличии кишечной палочки появляется помутнение, меняется цвет индикатора, и образуются пузырьки газа в поплавках.

Метод мембранных фильтров. Суть этого метода заключается в концентрировании бактерий из определенного объема на мембранных фильтрах с выращиванием их на поверхности агара Эндо и последующим учете количества БГКП в 1л воды.

Первый день: готовят прибор Зейтца – протирают спиртовым тампоном, обжигают в пламени спиртовки металлические детали.

Готовят мембранные фильтры №3 из нитроцеллюлозы, с диаметром пор 0,7 мкм, которые задерживают на своей поверхности БГКП. Фильтры кипятят 10-15 мин дистиллированной воде, затем с соблюдением асептики фильтр матовой поверхностью вверх кладут на сетку фильтрационного прибора Зейтца. В воронку прибора наливают исследуемую воду, а в приемной колбе Бунзена создают вакуум при помощи водоструйного насоса. Исследуемая вода фильтруется через мембранный фильтр, бактерии, находившиеся в ней, остаются на поверхности. После окончания фильтрации воды мембранный фильтр матовой стороной вверх переносят на агар Эндо в чашках Петри (на одной чашке можно разложить четыре фильтра). Чашки ставят в термостат при 37⁰С на сутки. Через поры мембранного фильтра происходит диффузия питательных компонентов среды Эндо, вследствие

этого оставшиеся БГКП размножаются и за сутки на поверхности фильтра образуют типичные колонии – красные с металлическим оттенком.

Водопроводная вода засеивается (исследуется) в объеме 333 мл, которые последовательно пропускают через четыре фильтра по 200, 100, 30 и 3 мл воды.

Второй день: учитывают наличие или отсутствие колоний на поверхности фильтров, находящихся на агаре Эндо в чашках Петри:

- отсутствие колоний на поверхности фильтрата или наличие колоний, не характерных для БГКП, позволяет дать отрицательный ответ на присутствие кишечной палочки в исследуемом объеме воды;

- при наличии на фильтре колоний, характерных для БГКП, - красных с металлическим блеском – исследование продолжают.

Для этого готовят препараты из подозрительных колоний, окрашивают, микроскопируют. При обнаружении грамтрицательных палочек ставят оксидазную пробу. При отрицательном результате оксидазного теста бумага на месте нанесения бактериальной культуры цвет не изменяет, следует учесть, что кишечная палочка относится к оксидазоотрицательным бактериям.

Результат выражают в виде коли-индекса, определяемого суммированием числа колоний кишечных палочек, выросших на поверхности всех мембранных фильтров из всех проб воды, и пересчета этого количества на 1000 мл воды.

Для перевода коли-титра в коли-индекс 1000 делят на показатель коли-титра, а для перевода коли-индекса в коли-титр 1000 делят на число, выражающее коли-индекс. Например, при исследовании пробы воды профильтровано 3 объема по 100 мл. На первом фильтре выросло 3 колонии, на втором фильтре – всего 2 колонии, на третьем -10 колоний, т.е. в общей сложности 15 колоний. Коли-титр этой воды будет равен $300 \text{ мл} : 15 = 20 \text{ мл}$; т.е. 20 мл – это наименьший объем воды, в котором находится одна кишечная палочка.

Теперь, зная коли-титр, мы определяем коли-индекс по формуле:

$$\text{Коли-индекс этой воды} = \frac{1000}{\text{коли-титр}} = \frac{1000}{20} = 50$$

$$\text{Коли-титр этой воды} = \frac{1000}{\text{коли-индекс}} = 20$$

Таким образом, коли-индекс исследуемой воды равен 50, т.е. в 1000 мл воды находится 50 кишечных палочек.

Для приготовления разведений воды используют следующий метод.

Из колбы, в которую отобрана проба воды для исследования, пипеткой берут 2мл; 1 мл вносят в первую стерильную чашку Петри и 1 мл – в первую пробирку с 9 мл стерильной воды. Получается разведение 1:10. Второй пипеткой перемешивают воду в первой пробирке. Затем этой же пипеткой 1 мл разведения переносят во вторую стерильную чашку Петри и 1 мл – во вторую пробирку с 9 мл стерильной воды, но не перемешивают. Третьей пипеткой перемешивают воду во второй пробирке (разведение 1:100) и 1 мл переносят в третью чашку. После внесения в каждую чашку по 1 мл воды в разведении 1:100, 1:10 и неразведённой выливают 10-12 мл расплавленного и охлаждённого до 45°С МПА. Чашку быстро закрывают и вращательным движением перемешивают расплавленный МПА с водой. На крышке чашки Петри карандашом делают надписи с указанием даты посева, разведения, фамилии сотрудника, делавшего разведение. Чашки переворачивают вверх дном и ставят на сутки в термостат при температуре 35-37°С. По количеству выросших колоний, с учётом разведения, судят о содержании микробов в засеянном объёме воды.

Согласно СанПиНу 2.1.4.1074-01 допустимое общее микробное число (число образующих колоний бактерий в 1 мл) в питьевой воде не более 50.

Согласно СанПиНу 2.1.4.1075-02 допустимое общее микробное число (число образующих колоний бактерий в 1 мл) к воде нецентрализованного водоснабжения не более 100.

Наличие общих колиморфных бактерий, термотолерантных колиморфных бактерий, колифагов, спор сульфитредуцирующих клостридий недопустимо.

Исследование воздуха: воздух не является средой обитания микробов, но в нём всегда содержится определённая взвесь микробов, поднятых вместе с пылью с земли, пола и др. Большинство микроорганизмов, находящихся в воздухе, являются сапрофитами, но в воздухе помещений могут встречаться и паразиты: туберкулёзная палочка, возбудитель стригущего лишая, споры возбудителя столбняка и др. Выделить из воздуха чистую культуру трудно, и поэтому в санитарном отношении имеет значение определение общего количества микробов в одном кубометре воздуха. Большое количество микробов в воздухе служит показателем плохой вентиляции помещения. В

таких помещениях заболевания животных, в том числе и инфекционные, наблюдаются чаще.

Исследование воздуха методом оседания микробов по Коху.

Чашки Петри с питательной средой открывают на 5 мин (а иногда и на более продолжительное время, в зависимости от загрязнения) в том помещении, где необходимо определить чистоту воздуха. Чашки закрывают и ставят в термостат при температуре 30-35°C на 2-3 суток. Подсчёт колоний проводят по всей площади чашки. Считают, что из каждой живой микробной клетки вырастает колония. Примерно на площади 100 см² в течение 5 мин оседает столько микробов, сколько их содержится в 10 л воздуха, а в одном кубометре – в 100 раз больше.

Пример: в чашке Петри с МПА (площадь чашки Петри 60 см²) выросло 20 колоний. Нужно рассчитать, сколько их будет на площади 100 см². Для этого составляем пропорцию:

60 см² - 20 колоний (клеток)

100см² – X колоний

X= 100×20 : 60 = 33,3 микробной клетки

Это количество микробов находится в 10 литрах воздуха, а в одном кубометре воздуха – в 100 раз больше: 33,3×100=3330 микробных клеток.

Если исследование воздуха проводили в разных местах помещения, то находят среднее арифметическое, которое будет являться показателем микробной обсеменённости воздуха.

Исследование воздуха с помощью прибора Кротова.

При этом методе исследования получают наиболее точные результаты. Прибор состоит из приспособления для отбора проб воздуха, микроманометра и питающего элемента (электрической части). В крышке приспособления для отбора проб воздуха имеется радиально расположенная щель, через которую поступает воздух. Принудительное поступление воздуха осуществляется вентилятором, который делает около 4000-5000 оборотов в минуту. Воздух соприкасается с поверхностью питательной среды в чашке Петри, помещенной на вращающийся диск прибора, и оставляет в ней микроорганизмы. Чашка со средой тоже вращается вихревым потоком воздуха со скоростью примерно 60 оборотов в минуту.

Засасываемый через щель воздух выходит через два штуцера. Один из них сообщён с внешней средой, а другой через резиновую трубку – с микроманометром, на котором нанесены деления от 0 до 50, обозначающие количество литров воздуха, проходящее через 1 мин через щель крышки.

Для определения объёма прошедшего воздуха необходимо показания на шкале манометра умножить на число минут. Содержание микробов в одном литре воздуха определяют путём деления количества выросших колоний на количество литров прошедшего воздуха. Для определения содержания микробов в одном кубическом метре воздуха полученное число умножают на 1000.

Инкубирование посевов производится так же, как при посеве по методу Коха.

Пример. За 5 мин через прибор Кротова было пропущено 200 литров воздуха (40 л/мин). В чашке Петри с МПА выросло 160 колоний. Отсюда в одном литре воздуха содержится $160:200=0,8$ микробных клеток, а в одном кубометре – в 1000 раз больше, т.е. $0,8 \times 1000=800$ микробных клеток.

Считается допустимым в помещениях для крупного рогатого скота следующее содержание микробов в 1 м^3 :

- в сухостойном цехе – не более 70 тыс;
- в родильном цехе – не более 50 тыс;
- в профилактории – не более 20 тыс (Ветеринария, №1,1987,с.9).

Задание для самостоятельной работы:

1. Произвести отбор пробы воды и воздуха. На следующем занятии подсчитать количество микроорганизмов. Определить степень обсеменённости. Результаты записать в тетрадь.

Контрольные вопросы:

1. Как производится отбор пробы почвы для микробиологического исследования?
2. Как производится отбор пробы воды для микробиологического исследования?
3. Как определяется общая обсеменённость воды?
4. Как производится отбор пробы воздуха для микробиологического исследования?

ЗАНЯТИЕ №13

Микробиологическое исследование кормов

Цель занятия: ознакомиться с правилами взятия проб сена, соломы, силоса и др.; изучить методы микробиологического исследования различных видов кормов.

Материалы и оборудование: фарфоровые ступки с пестиками (стерильные), колбы, центрифуга, предметные стёкла, набор красителей, спиртовки, бактериологические петли, пипетки, микроскопы, кедровое масло, набор стерильных питательных сред (МПБ, МПА, МППБ и др.), вытяжка из силоса, весы, универсальный индикатор, бумага индикаторная для определения рН силоса.

Содержание: микробиологическое исследование кормов проводят в тех случаях, когда есть подозрения на присутствие в них патогенных микробов или их токсинов. В кормах могут быть обнаружены плесневые грибы, гнилостные, маслянокислые и другие микроорганизмы.

1. Исследование сена и соломы.

Для исследования сена и соломы в лабораторию направляют пробы, взятые из разных мест скирды или стога. Иногда возникает необходимость исследовать остатки корма из кормушек. Пробы корма упаковывают в чистую бумагу.

При исследовании сена обращают внимание на его загрязнённость такими споровыми формами патогенных бактерий, как возбудители сибирской язвы, эмфизематозного карбункула и др.

Присланное в лабораторию сено измельчают ножницами, помещают в стерильную колбу. Заливают стерильным физиологическим раствором. Колбу в течение нескольких минут встряхивают, чтобы смыть с сена имеющихся на нём бактерий, жидкость фильтруют через ватный или марлевый фильтр, прогревают при $t=80^{\circ}\text{C}$ несколько минут (для уничтожения вегетативных форм). Затем жидкость центрифугируют, верхний слой сливают, а из осадка делают высевы на МПБ, МПА и Китта-Тароцци. Одновременно производят заражение белых мышей, морских свинок, кроликов. Полученные бактериальные культуры исследуют до определения вида бактерий.

2. Исследование силоса.

Для определения микрофлоры силоса пробы его необходимо брать в три срока:

- а) во время закладки силоса для определения эпифитной микрофлоры;
- б) через 10-15 дней после закладки для определения микрофлоры созревшего силоса;

в) при вскрытии силоса.

В общей массе силоса не во всех её участках одинаково проходят микробиологические процессы, поэтому. Например, в траншеях, в зависимости от длины, берут 2 или 3 пробы на глубине одного метра от поверхности. В круглых ямах пробу берут в центре после снятия верхнего слоя, также на глубине одного метра. Пробы силоса помещают в стерильные банки с притёртыми пробками.

В лаборатории проводят микроскопические, микробиологические исследования силоса, устанавливают присутствие в нём ботулинического токсина и оценивают качество силоса.

Микроскопическое исследование силоса:

В фарфоровой ступке с небольшим количеством дистиллированной воды растирают кусочек силоса. Из растёртой массы на предметном стекле пестиком делают мазок, его фиксируют и окрашивают эритрозином. Мазок рассматривают под иммерсионной системой и зарисовывают. В хорошем силосе встречаются единичные палочки и кокки, в плохом – большое количество кокков и палочек.

Микробиологическое исследование силоса:

Проводят для выявления разных физиологических групп микроорганизмов: молочнокислых, маслянокислых, гнилостных, газообразующих, дрожжей и плесеней.

Перед посевом готовят разведения. С этой целью на технических весах отвешивают 40 г силосной массы. Навеску с соблюдением правил стерильности переносят в стерильную банку с притёртой пробкой, в которую налито 360 мл стерильной воды. Чтобы отмыть микроорганизмы, содержащиеся на поверхности силосной массы, взвесь в банке взбалтывают в течение 10 мин. В банке получается разведение 1:10. Из него готовят разведения 1:100, 1:1000 и т.д.

Физиологические группы микроорганизмов определяют на следующих питательных средах: МПЖ, МПА – гнилостную микрофлору, СА – плесени и дрожжи, САМ (сусло-агар с мелом) и молоке – молочнокислые бактерии, лактозе – газообразующие (кишечные) бактерии.

В эти среды вносят по 1 мл разведений и выращивают в термостате при $t=30-35^{\circ}\text{C}$ в течение 3-х суток. На четвертые сутки проводят учёт физиологических групп микроорганизмов согласно методике, описанной Н.Р.Асоновым (1988).

Оценка качества силоса:

а) Органолептическая оценка силоса:

Цвет должен быть ближе к цвету растений, из которых приготовлен силос. У доброкачественного силоса могут встречаться оттенки: жёлтый, жёлто-зелёный, коричнево-зелёный, светло-коричневый.

У испорченного силоса преобладает коричневый цвет; обычно он бывает тёмно-коричневый, грязный.

Запах доброкачественного силоса должен быть приятным, напоминающим запах плодов, хлебного кваса, мочёных яблок. При порче силоса появляется запах уксуса. Испорченный силос имеет запах редьки, прогорклого масла, селёдки, долго не исчезающий при растирании кусочка силоса между пальцами. При наличии в силосе масляной кислоты, растёртый между пальцами силос издаёт неприятный запах навоза.

Вкус доброкачественного силоса слабокислый, приятный. Такой силос хорошо поедается животными. У испорченного силоса вкус резко-кислый, с горьковатым привкусом.

Консистенция у доброкачественного силоса должна быть такой, какую имели исходные растения. У испорченного силоса растительная масса делается ослизлой, мажущей, листочки не отделяются друг от друга.

б) Химическая оценка силоса.

Вначале готовят вытяжку из силоса. Для этого в литровую банку (колбу) помещают 100 г мелко нарезанного силоса. В банку приблизительно 3/4 объёма наливают дистиллированную воду. Тщательно взбалтывают и доливают до 1 литра. Содержимое в течение 4-5 часов периодически взбалтывают. Затем отфильтровывают и фильтрат используют для разных целей (например, для определения рН).

Определение рН силоса.

Пипеткой в фарфоровую чашечку или углубление вносят 1 мл вытяжки и каплю универсального индикатора.

При смешивании жидкостей происходит изменение окраски вытяжки. рН силоса определяют по стандартной шкале.

Можно для этих целей использовать индикаторную бумагу для определения рН силоса. Для этого полоску индикаторной бумаги прижимают стеклянной палочкой к силосу до её смачивания и полученную окраску немедленно сравнивают со шкалой.

Оценка качества силоса в баллах (по А.М.Михину)

Окраска жидкости (вытяжки) после добавления индикатора	Величина рН	Балл
Определение рН силоса		
Красная	4,2 и ниже	5
Красно-оранжевая	4,2-4,6	4
Оранжевая	4,6-5,1	3
Жёлтая	5,1-6,1	2
Жёлто-зелёная	6,1-6,4	1
Зелёная	6,4-7,2	0
Зелёно-синяя	7,2-7,6	0
Запах		
Ароматно-фруктовый, слабокислый, хлебный		4
Слабоароматный, уксусно-кислый, огуречный		3
Резко уксуснокислый, запах масляной кислоты		2-1
Затхлый, навозный, сильный запах масляной кислоты		0
Цвет силоса		
Зелёный		3
Охряный или жёлто-зелёный		2
Чёрно-зелёный		1
Чёрный		0

Данные бальной оценки при определении рН, запаха, цвета суммируют, получают общий балл, по которому и определяют качество силоса.

Очень хороший 11-12 баллов

Хороший 9-10 баллов

Среднего качества 7-8 баллов

Плохой 4-6 баллов

Силос, имеющий оценку 3 балла и ниже, считается очень плохим и к скармливанию животным не пригоден.

3. Исследование кровяной, мясо-костной и рыбной муки.

Исследуемый продукт разводят физиологическим раствором поваренной соли в соотношении 1:100 и 1:1000. Смесь хорошо взбалтывают, дают отстояться, и определённое количество водного извлечения (0,1-0,2 мл)

засевают на сахарный агар в бактериологических чашках и на среду Китта-Тароции.

Посевы помещают в термостат при $t=37^{\circ}\text{C}$. Через двое суток производят подсчёт колоний, выросших на агаре в чашках, и пересчёт их количества на содержание бактерий в 1 г корма. Чашки просматривают на наличие колоний сибиреязвенной палочки, сальмонеллёзных бактерий, кишечной палочки и др.

Культуры на Китта-Тароции выдерживают в термостате 5-8 сут, а затем вводят 0,3-0,5 мл под кожу белым мышам для обнаружения ботулинического токсина.

Кормовые продукты, в которых найдены патогенные микробы или их токсины. Для кормовых целей не допускаются.

Задание для самостоятельной работы:

1. Произвести исследование силоса. Дать ему оценку в соответствии с таблицей №1. Результаты записать в тетрадь.

Контрольные вопросы:

1. Лабораторное исследование сена и соломы?
2. Сколько раз берут пробу силоса для микробиологического исследования?
3. Что включает в себя органолептическая оценка силоса?
4. На какие питательные среды производится посев при исследовании мясо-костной муки? Почему?

ЗАНЯТИЕ №14

Пороки мяса микробного происхождения

Цель занятия: изучить пороки мяса, возникающие в результате обсеменения его микроорганизмами.

Материалы и оборудование: плакаты, рисунки.

Содержание:

Мышцы и внутренние органы (за исключением ЖКТ) здоровых животных и птиц не содержат микробов. Однако при убое животных происходит обсеменение туш микроорганизмами.

Известны два пути обсеменения эндогенное и экзогенное:

1. **Прижизненное эндогенное** микробное обсеменение происходит у животных, больных инфекционными, инвазионными и незаразными заболеваниями, т.к. их органы и ткани содержат возбудителей болезни, например, сальмонеллеза, рожи свиней, лептоспироза, листериоза.

Посмертное эндогенное обсеменение органов и тканей происходит в момент убоя. Обсеменение происходит при снятии шкур и разделки туши. После смерти животного стенка кишечника становятся легкопроницаемыми для микробов, которые начинают проникать в окружающие ткани. При повреждении кишечника происходит чрезвычайно сильное загрязнение мяса, подвижные микробы проникают в глубокие слои мяса при последующей транспортировке и хранении.

2. **Экзогенное загрязнение** мяса происходит при выполнении технологических операций по разделке туш. Источниками обсеменения в данном случае являются кожный покров животных, воздух, оборудование, руки и инструменты рабочих, вода, используемая для зачистки туш.

На поверхности туш могут находиться микроорганизмы, имеющие неодинаковые температурные пределы роста, например, мезофилы, термофилы и психрофилы.

В процессе длительного хранения в охлажденной туше могут развиваться только психрофилы, т.к. температура мяса будет составлять 0-4°C. Термофилы и большинство мезофильных бактерий, не развивающихся при низких температурах, полностью приостанавливают свою жизнедеятельность, переходя в анабиоз. Однако некоторые бактерии из группы мезофилов могут длительное время сохранять свою жизнеспособность (возбудители листериоза и ботулизма).

На охлажденном мясе в аэробных условиях хранения размножаются неспоровые гр (-) бактерии, а также плесневые грибы и дрожжи. В результате активного размножения микроорганизмов появляются пороки мяса микробного происхождения.

1. **Ослизнение** – наиболее часто встречающийся вид порчи охлажденного мяса. Оно появляется в начальный период хранения. Размножающиеся на мясе микроорганизмы сначала образуют отдельные колонии, которые затем сливаются в виде сплошного мажущегося слизистого налета мутно-серого или буровато-зеленого цвета. Слизь становится заметной, когда количество бактерий на 1 см² увеличивается до 10⁷.

Возбудители: аэробные психрофильные гр (-) бактерии рода *Pseudomonas*. Аэробные дрожжи, микрококки, стрептококки, актиномицеты. Анаэробные психрофильные лактобациллы, микробактерии рода *Aeromonas*.

При ослизнении мясо зачищают, удаляя измененные участки, и при отсутствии отклонений по показателям свежести немедленно используют на промышленную переработку. В случае изменения свежести мясо исследуют в лаборатории и используют в зависимости от полученных результатов.

2. Гниение. При хранении мяса с признаками ослизнения происходит дальнейшая его порча — гниение. Его вызывают различные аэробные и факультативно-анаэробные неспорообразующие бактерии, а также спорообразующие аэробные и анаэробные бактерии. Гниение может происходить как в аэробных, так и в анаэробных условиях. В процессе гниения под влиянием протеолитических ферментов гнилостных бактерий осуществляется постепенный распад белков мяса с образованием неорганических конечных продуктов — аммиака, сероводорода, диоксида углерода, воды и гипофосфатов (при аэробном процессе) и с накоплением большого количества органических веществ, образующихся в результате неполного окисления продуктов — индола, скатола, масляной и других органических кислот, спиртов, аминов (при анаэробном процессе).

Гниение, вызываемое аэробными и факультативно-анаэробными бактериями, попавшими на мясо при экзогенном обсеменении после убоя, разделки и хранения мяса, начинается с поверхности мясных туш. Вначале на ней вырастают микроскопические микробные колонии. Видимых органолептических изменений мяса в это время не отмечается. Затем колонии разрастаются, их количество увеличивается. Поверхность мяса приобретает серую или серовато-зеленую окраску, размягчается. Понижается упругость мышечной ткани, изменяется запах мяса. В дальнейшем гнилостные бактерии проникают в толщу мяса и вызывают распад мышечной ткани. Реакция мяса постепенно переходит из слабокислой в щелочную вследствие образования аммиака и других соединений.

Анаэробное гниение мяса начинается в глубине мышечной ткани. Оно вызывается анаэробными и факультативно-анаэробными бактериями, чаще всего проникающими в мясо из кишечного тракта эндогенным путем. При анаэробном гниении наблюдаются такие же изменения цвета, консистенции и других органолептических показателей мяса, как при

аэробном процессе гнилостного распада, которые сопровождаются еще более неприятным, зловонным запахом, так как при этом образуется значительно большее количество дурно пахнущих веществ. В обычных условиях при гниении мяса чаще всего одновременно происходят как анаэробные, так и аэробные процессы.

Возбудители: При температуре хранения около 0°C - *Pseudomonas*.

При повышенных температурах хранения гниение мяса вызывают мезофильные гнилостные микроорганизмы:

неспорообразующие бактерии — *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens* (чуд пал), *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Bac. Mycoides* (грибовидная пал) и другие аэробные бациллы;

анаэробные клостридии — *Cl. sporogenes*, *Cl. Putrificus*, *Cl. perfringens*.

Мясо с признаками гниения непригодно для пищевых целей и подлежит технической утилизации, так как содержит много ядовитых веществ.

3. Кислое брожение. Иногда мясо подвергается кислому брожению, которое сопровождается появлением неприятного, кислого запаха или зеленовато-серой окраски на разрезе и размягчением мышечной ткани. Микроорганизмы, размножаясь в продукте, ферментируют углеводы мышечной ткани с выделением органических кислот.

Возбудители: психрофильные лактобациллы, микробактерии и дрожжи, которые способны развиваться в глубине мышечной ткани, где создается низкая концентрация кислорода.

Такое мясо можно использовать на основании результатов лабораторного исследования.

4. Пигментация. На поверхности мяса вследствие размножения и образования колоний пигментобразующих микроорганизмов появляются окрашенные пятна.

Возбудители: флуоресцирующая палочка (*B. fluorescens*), синегнойная палочка (*B. ruosyanea*), чудесная палочка (*Serratia marcescens*) и другие аэробные бактерии, различные сарцины, пигментные дрожжи, чаще всего рода *Torula*.

При отсутствии отклонений в показателях свежести мясо после удаления пигментных пятен направляют на немедленную промышленную переработку.

5. Свечение. Вид порчи возникает в результате размножения на поверхности мясной туши фотогенных (светящихся) бактерий, которые обладают способностью свечения — фосфоресценцией. Свечение

обусловлено наличием в клетках светящихся бактерий фотогенного вещества (люциферина). Большинство светящихся бактерий содержится в морской воде и на теле обитателей моря, в том числе на рыбе. Поэтому эти микроорганизмы часто попадают на мясо при его хранении вместе с рыбой. Фотогенные бактерии хорошо размножаются на рыбе и мясе, но не вызывают изменений их запаха, консистенции и других органолептических показателей.

Возбудители: Фотогенные бактерии (психрофильные облигатные аэробы). К группе фотобактерий относят различные неспорообразующие грамотрицательные и грамположительные палочки, кокки и вибрионы. Типичный представитель фотогенных бактерий — фотобактериум фосфореум *Photobact. phosphoreum* — подвижная коккоподобная палочка.

После зачистки пораженных участков мясо с признаками свечения направляют на немедленную промышленную переработку.

6. Плесневение. При соблюдении установленного температурно-влажностного режима хранения плесневение охлажденного мяса наблюдается редко, так как развитие возбудителей этого вида порчи — плесневых грибов обычно подавляется активно растущими психрофильными аэробными бактериями. Оно происходит только в случаях хранения охлажденного мяса при более низкой температуре и в условиях пониженной влажности, поскольку плесневые грибы менее требовательны к влажности и имеют более низкие температурные пределы роста, чем аэробные бактерии.

Плесени — аэробные микроорганизмы и развиваются, как правило, на поверхности мясной туши, наиболее активно на участках, где интенсивнее движение воздуха. На развитие этих микроорганизмов влияет повышенная влажность, поэтому часто их рост наблюдается на более увлажненных участках (паховые складки, внутренние поверхности ребер и др.). Развиваясь на мясе, плесени вызывают уменьшение количества азотистых веществ, повышение щелочности, распад белков и жира. Мясо приобретает затхлый запах.

Возбудители: плесени родов тамнидиум (*Thamnidium*), ризопус (*Rhizopus*) и кладоспориум (*Cladosporium*), которые имеют наиболее низкую минимальную температуру роста и активно размножаются в условиях холодильного хранениями $-5...-10^{\circ}\text{C}$, когда рост других плесневых грибов прекращается или сильно задерживается.

При плесневении с поражением только поверхностных слоев после зачистки мясо можно использовать для промышленной переработки. При поражении глубоких слоев и изменении органолептических показателей мясо направляют на техническую утилизацию.

Контрольные вопросы:

1. Как происходит обсеменение органов и тканей животных микроорганизмами?
2. Какие изменения происходят при хранении мяса в холодильнике?
3. Чем опасно употребление в пищу мяса с признаками гниения?
- 4.

ЗАНЯТИЕ №15

Бактериоскопическое исследование мяса сельскохозяйственных животных.

Цель занятия: изучить методы бактериоскопического исследования сырого мяса животных.

Материалы и оборудование: образцы мяса различной степени свежести, предметные стекла, набор для окраски по Граму, пинцеты, ножницы, скальпель, спиртовки, микроскопы.

Содержание:

Бактериологическое исследование мяса и мясных продуктов проводят в соответствии с ГОСТ 21237-75 «Мясо. Методы бактериологического анализа». Его проводят во всех случаях, предусмотренных научно-технической документацией (НТД) и правилами ВСЭ, а именно:

- при вынужденном убое животных независимо от причин убоя;
- при желудочно-кишечных болезнях и тяжело протекающих заболеваниях органов дыхания;
- при подозрении в обсеменении мяса возбудителями зооантропонозов или пищевых токсикоинфекций и токсикозов;
- при удалении кишечника из туши позже 2ч после убоя животного.

На бактериологическое исследование отправляют мясо, если невозможно определить его пригодность в пищу по результатам органолептического исследования, а также по ряду физико-химических показателей.

Микробиологический контроль мяса и мясопродуктов проводят для определения количества МАФАНМ, бактерий группы кишечных палочек

(БГКП), возбудителей зооантропонозов, обнаружения сальмонелл, палочек протей, токсичных стафилококков и патогенных анаэробов в случае сомнений в отношении пригодности мяса и невозможности определить его пригодность в пищу путем ветеринарно-санитарного осмотра.

Для микроскопического исследования мяса из каждой пробы готовят препараты- отпечатки. В каждом препарате изучают не менее 25 полей зрения.

Готовят мазок-отпечаток с поверхностного слоя и с внутреннего слоя. Для этого кусочек пробы прикладывают и прижимают к первому стерильному предметному стеклу. Затем пробу смачивают спиртом и поджигают. Таким образом поверхность мяса остается стерильной. Затем стерильными ножницами вырезают из середины кусочек размером 1,5×2×2,5 см и прикладывают ко второму предметному стеклу местом свежего среза. Мазки высушивают на воздухе, фиксируют. Готовые мазки окрашивают по Граму и подсчитывают количество микроорганизмов в каждом поле зрения, учитывая отдельно шаровидные и палочковидные.

Таблица №2

Оценка свежести мяса микроскопическим способом

Степень свежести мяса	pH мяса	Микроскопические показатели (1 поле зрения)
Свежее	5,8-6,2	Мазок почти незаметный, на стекле нет ткани, слабо окрашен. Из поверхностного слоя - единичные кокки или палочки; из глубинных слоев – микробы отсутствуют.
Сомнительной свежести	6,3-6,5	На стекле следы распада мышечной ткани, мазок хорошо окрашен. В поле зрения 20-30 кокков, единичные палочки.
Несвежее	6,7 и выше	Плотный жирный мазок, интенсивно окрашен, на стекле распавшаяся мышечная ткань. Из поверхностных и глубинных слоев преобладают палочки. При сильном разложении мяса кокки почти отсутствуют. Среди них <i>Bac.subtillis</i>

Задание для самостоятельной работы:

1. Произвести исследование мяса. Произвести подсчет кокков и палочек отдельно не менее чем в 5 полях зрения. Дать оценку исследуемому мясу в соответствии с таблицей №2. Результаты записать в тетрадь.

Контрольные вопросы:

1. В каких случаях проводят микробиологическое исследование мяса?
2. Как готовят мазки-отпечатки из проб мяса?
3. Чем характеризуется мазки, приготовленные из свежего, сомнительной свежести и несвежего мяса?

ЗАНЯТИЕ №16

Определение количества МАФAnM.

Цель занятия: изучить методы бактериологического исследования сырого мяса.

Оборудование: образцы мяса различной степени свежести. Чашки Петри, расплавленный и охлажденный МПА, ступки, среды Эндо и Левина.

Содержание: Исследуемый образец мяса перед посевом освобождают от видимой жировой и соединительной ткани, погружают на 2-3 мин в этиловый спирт и обжигают поверхность. Затем стерильными ножницами из глубины различных мест каждого образца вырезают кусочки размером не менее 2×1,5×2,5 см. Лимфатические узлы разрезают пополам.

Все кусочки измельчают с соблюдением правил асептики, для посева составляют две пробы по 15 г каждая. Одна проба – кусочки мышц и лимфатических узлов, вторая – кусочки паренхиматозных органов.

Каждую пробу помещают в стерильный стакан гомогенизатора, добавляют 15 мл физиологического раствора и гомогенизируют не более 2-3 мин (при этом 1 мл приготовленной взвеси содержит 0,5 г продукта).

Полученную взвесь отстаивают 10 мин. Из верхней надосадочной жидкости готовят ряд последующих разведений 1:10, 1:100, 1:1000. 1 г мяса и 1 мл из каждого разведений вносят параллельно в 2 чашки Петри, заливают расплавленным и охлажденным до +50° МПА. После застывания агара чашки помещают в термостат на 24-48 ч при t +30°С. Чтобы **определить количество мезофильных бактерий в 1 г мяса**, подсчитывают количество колоний в двух параллельных посевах, определяют среднеарифметическое число и умножают на степень разведения.

Для вычисления среднего арифметического нельзя использовать посеы, где количество выросших колоний на чашках менее 3 и более 300. При этом используют следующие формулировки в зависимости от результата:

-при отсутствии роста колоний – «Количество микроорганизмов менее 1»

- если оказалось, что при посеве из всех разведений на поверхности агара выросло менее 30 колоний, рекомендуется писать: «Рост единичных колоний при посеве (указать количество засеянного продукта)»;

- если на изучаемых чашках более чем на половине их площади имеется расползающийся рост спорообразующих микроорганизмов и подсчет изолированных колоний невозможен, в результате анализа следует написать: «Рост спорообразующих микроорганизмов».

Результаты исследований выражают в **КОЕ** – колонии образующие единицы в г/мл.

Мясо оценивают в соответствии с Санитарными правилами и нормами (СанПиН), в 1 г парного мяса допускается не более 10КОЕ/г МАФАНМ, в охлажденных и переохлажденных отрубках не более 1000 КОЕ/г МАФАНМ.

Задание для самостоятельной работы:

1. Произвести посев с мяса для определения количества МАФАНМ. Подсчитать КОЕ.

Контрольные вопросы:

1. Какие чашки Петри используют для подсчета колоний?

ЗАНЯТИЕ №17

Индикация кишечной палочки и сальмонелл в пробах мяса.

Цель занятия: изучить методы индикации кишечной палочки и сальмонелл в пробах сырого мяса.

Оборудование: образцы мяса различной степени свежести, раствор натрия хлорида 0,9%, бульон лактозный с бриллиантовым зеленым или желчью, среда Кесслера.

Содержание:

Escherichia coli – гр (-) палочки, спор и капсул не образуют, подвижны, ферментируют лактозу и маннит, не разжижают желатин, не выделяют сероводород,

образуют индол, не утилизируют цитраты и не растут на среде Симмонса, дают положительную реакцию с метиленовым красным и отрицательную – Фогеса-Проскауэра, не расщепляют мочевины.

Для выявления БГКП в определенной навеске мяса готовят исходное и ряд 10-кратных разведений на физрастворе с таким расчетом, чтобы в посевах на плотных питательных средах получить изолированные колонии. Затем по 1 мл различных разведений вносят в жидкие питательные среды (бульон лактозный с бриллиантовым зеленым или желчью, среда Кесслера). Посевы выдерживают в термостате при температуре +37°C, предварительный учет проводят через 24 ч, окончательный – через 48 ч по интенсивному росту микроорганизмов, признаками которого являются помутнение среды, образование газа, изменение цвета индикатора в результате подкисления рН.

Для подтверждения принадлежности микроорганизмов к БГКП проводят посев 0,1 мл культуральной жидкости на одну из дифференциально-диагностических сред (Эндо, Смирнова). На агаре Эндо через 24 ч образуются малиново-красные колонии с металлическим блеском, на среде Смирнова – желтые колонии с изменением среды в тот же цвет.

Из посевов отбирают не менее пяти колоний, готовят мазки, окрашивают по Граму, изучают морфологические и тинкториальные свойства, проводят серологическую типизацию культур эшерихий при помощи набора типоспецифических агглютинирующих О-колических сывороток.

По классификации, утвержденной Международным номенклатурным комитетом в 1964 г., род эшерихий насчитывает около 160 сероваров.

В 1 г парного мяса в соответствии с Санитарными правилами и нормами бактерии группы кишечной палочки не допускаются.

Salmonella - гр (-) палочки, подвижные, за исключением *S.pullorum-gallinarum*, не ферментируют лактозу и сахарозу, расщепляют глюкозу и маннит, выделяют сероводород, не образуют индол.

Для определения наличия сальмонелл, готовят навеску мяса массой 25 г, вносят её в колбу с 225 мл среды обогащения (селенитовый бульон, тетратионатная среда) с последующим выдерживанием в термостате (соответственно при t +37°C и +42°C) в течение 24-48 ч.

При появлении роста на средах обогащения из них делают пересев на плотные селективно- диагностические среды в чашках \петри (агар Эндо, Левина, ВСА) по секторам для получения изолированных колоний.

Т.к. сальмонеллы не ферментируют лактозу, в подавляющем большинстве дают типичный рост на дифференциально диагностических средах:

- Эндо – круглые, бесцветные колонии;
- Левина – прозрачные, нежно-розовые колонии;
- Смирнова- прозрачные, серовато-фиолетовые колонии;
- Плоскирева – бесцветные колонии, но более плотные и меньшего размера, чем на среде Эндо;

- ВСА (применяют для целенаправленного выделения сальмонелл) – как правило, чёрные или коричневые колонии с характерным металлическим блеском. При этом наблюдается прокрашивание в чёрный цвет участка среды под колонией.

Из колоний, подозрительных на сальмонеллы, готовят мазки, окрашивают по Граму, изучают культуральные и ферментативные свойства. У всех подозрительных культур определяют антигенную структуру.

В соответствии с Санитарными правилами и нормами, в 25 г мяса не допускается присутствием патогенных бактерий, в том числе сальмонелл и листерий.

Таблица №3.

Микробиологические показатели мяса и мясопродуктов

Группа продуктов	МАФАнМ КОЕ/г не более	Масса продукта (г), в которой не допускают наличие бактерий		
		БГКП	СРК	Патогенные МО, в том числе сальмонеллы
Мясо свежее (все виды убойных животных)				
Парное в отрубях (полутуши, четвертины)	10	1,0	-	25
Охлажденное и переохлажденное в отрубях	1:10 ³	0,1	-	25
Мясо замороженное (все виды убойных животных)				
В отрубях (полутуши)	1×10 ⁴	0,01	-	25
Блоки из жилованного мяса (говядина, свинина, баранина)	5×10 ⁵	0,001	-	25
Субпродукты убойных животных (охлажденные, замороженные)				
Печень, почки, язык, мозги, сердце	-	-	-	25

ЗАНЯТИЕ №18

Бактериологическое исследование мяса птиц.

Цель занятия: изучить методы бактериологического исследования мяса кур.

Оборудование: тушки или окорочка куриного мяса, скальпели, пинцеты.

Содержание: Бактериологическое исследование мяса птицы регламентировано ГОСТом. Подготовку проб к исследованию проводят общепринятыми методами по ГОСТ 26668-85, ГОСТ 26669-85 и дополнениями по ГОСТ Р 50396.0-92. Количество МАФАНМ определяют в соответствии с ГОСТ Р 50396.1-92 и ГОСТ 7702.2.2-95.

Для анализа мяса здоровой птицы от партии отбирают не менее трёх тушек. С момента отбора и до начала исследования образцы хранят при $t_{0+2^{\circ}\text{C}}$ не более 24 ч.

Отбор проб от каждой тушки проводят одним из трёх методов:

- вырезанием кусочков мышц из различных участков;
- смыва со всей поверхности тушки смывной стерильной водой;
- смыва с поверхности тушки тампоном.

1. Метод вырезания кусочков туш используют для выявления сальмонелл, а также для определения других микробиологических показателей.

Из грудной части, голени и бедра вырезают на всю глубину мышцы в равных количествах. Масса отобранной пробы должна быть 100-150 г. Всю пробу измельчают ножницами с соблюдением правил асептики, растирают в фарфоровой ступке пестиком, перемешивают и получают объединённую пробу одной тушки или полутушки. 25 г продукта используют для исследования на сальмонеллы, а 10 г – для приготовления серии 10-кратных разведений для определения количества МАФАНМ.

2. Метод смыва со всей поверхности тушки используют для оценки санитарного состояния производства. В смывах определяют количество МАФАНМ, споры клостридий и бацилл, а также другие микроорганизмы по показаниям производства (наличие сальмонелл в смывах не определяют).

Для этого тушку массой не более 1,5 кг помещают в стерильный пакет из полимерных материалов. Наливают стерильную воду в количестве, равной массе тушки (1500 мл), встряхивают содержимое в течение 2 мин. Полученная смывная жидкость служит исходным материалом, из которого готовят серию 10-кратных разведений. Из соответствующих разведений

делают посе́вы по 1 мл одновременно в две чашки Петри, заливают 15 мл расплавленного и охлажденного до t 50-55°C МПА с глюкозой. Питательную среду тщательно размешивают круговыми движениями чашки по поверхности стола до равномерного распределения посевного материала. Чашки с посевами помещают в термостат вверх дном и выдерживают в 72 ч при t +30°C.

Результаты оценивают по каждой пробе отдельно. При этом подсчитывают все выросшие колонии, учитывают чашки, в которых количество колоний составляет 30-300.

Количество микроорганизмов в 1 г продукта или 1 мл смывной жидкости определяют по формуле:

$$X=(a \times 10^n) \times ((m+V):(m \times V))$$

Где, a – среднее арифметическое количество колоний в посевах; n – число 10-кратных разведений навески продукта; m – масса (объем) навески продукта (смыва), взятая для приготовления исходного разведения, г или мл; V – объём жидкости, взятый для приготовления исходного разведения навески продукта (смыва), г или мл.

3.Отбор проб методом смыва стерильным тампоном применяют к потрошенным тушкам любой массы. Смыв осуществляют с разных участков.

Общая площадь смывной поверхности тушек крупной птицы должна составлять 100 см² (по трафарету). Смыв проводят 2-5 тампонами, которые помещают в колбу со 100 мл стерильной жидкости и встряхивают в течение 2 мин. Полученная смывная жидкость служит исходным материалом для приготовления последовательных 10 – кратных разведений. Расчет количества микроорганизмов проводят на 1 см² поверхности тушки.

Количество микроорганизмов на 1 см² поверхности продукта определяют по формуле:

$$X_1=(a \times 10^n) \times (V/ S \times V_1),$$

где S – общая площадь анализируемой поверхности, см²;

V_1 – объём инокулята, внесенного в чашку Петри, мл;

V – объём жидкости, взятый для приготовления исходного разведения навески продукта (смыва), г или мл;

n – число 10-кратных разведений навески продукта.

Результаты вычисления количества микроорганизмов в 1 г продукта (в 1 мл смыва с продукта смывной жидкостью или на 1 см² поверхности

продукта при смыве тампоном) выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ) от 1,0 до 9,9 умноженным на 10^n , т.е. степень разведения.

При показателе МАФАНМ более $1,0 \times 10^7$ КОЕ/г и при отсутствии признаков органолептической порчи вышеперечисленные продукты не подлежат хранению в охлажденном состоянии. Их срочно направляют на изготовление термически обработанных продуктов или заморозку.

При показателе МАФАНМ более $1,0 \times 10^7$ КОЕ/г и признаками органолептической порчи направляют на утилизацию.

В соответствии с СанПином количество МАФАНМ в 1 г охлажденного и замороженного мяса птицы не должно превышать 100 тыс. КОЕ/г.

Индикация БГКП в мясе птицы

Метод основан на высеве определенного количества продукта в жидкие селективные лактозосодержащие среды (среду Кесслера), выращивание посевов при температуре $+37^\circ\text{C}$ в течение 48 ч, подтверждении принадлежности выросших микроорганизмов по сбраживанию лактозы с образованием кислоты и газа и морфологическим признакам.

Заключение об обнаружении БГКП дают на основании выделения гр (-) палочек, не образующих спор и капсул, подвижных, ферментирующих лактозу до кислоты и газа при температуре 37°C , указывая навеску продукта (г), объем (мл) или площадь смыва (cm^2).

Индикация сальмонелл

Индикация сальмонелл в мясе птицы основана на высеве определенного количества продукта (или смывов с его поверхности) на жидкие селективные питательные среды с выделением чистых культур на дифференциально-диагностических средах, изучении морфологических и культурально-биохимических признаков сальмонелл, с дальнейшей их серологической типизацией (идентификацией).

Берут навеску продукта 25 г (или смыв не менее 25 cm^3) и высевают в пептонно-буферную воду в соотношении 1:5. Посевы инкубируют 24 ч при $t +37^\circ\text{C}$. Затем 10 мл культуральной жидкости из пептонно-буферной воды пересевают в 90 мл одной из сред обогащения (Мюллера, Кауфмана, селенитовую, магниевую) и инкубируют в термостате при $t +37^\circ\text{C}$. Через 24 и 48 ч из среды обогащения делают пересев на две любые дифференциальные среды (Эндо, Левина) по выбору и инкубируют 24 ч в термостате.

При отсутствии подозрительных колоний на дифференциальных средах работу с посевами прекращают. Подозрительные колонии используют в

дальнейших исследованиях, для этого отбирают не менее 5 типичных колоний. Изучают морфологические, тинкториальные, культуральные, биохимические свойства.

При обнаружении сальмонелл в партиях тушек птицы, в партиях бескостного кускового мяса вся партия должна быть направлена на изготовление консервов.

Выявление золотистого стафилококка

Для выявления стафилококка в мясе птицы 1 г продукта измельчают, готовят исходное и ряд 10-кратных разведений до 1:100. Из всех разведений делают посев по 1 мл в солевой бульон в соотношении к питательной среде 1:10. При выделении стафилококка из 1 г продукта используют 10 мл его первичного разведения. При появлении роста в солевой среде делают посев на поверхность агара Байрда-Паркера, яично-желточный солевой или яично-желточный азидный агар. Посевы на агаризированных средах просматривают после 18-24 ч инкубирования при $t +37^{\circ}\text{C}$. На среде Байрда-Паркера стафилококки растут в виде черных блестящих выпуклых колоний диаметром 1-2 мм, окруженных зоной лецитиназной активности в виде кольца шириной 1-3 мм. На яично-желточном солевом азидном агаре стафилококки растут в виде колоний различных оттенков желтого цвета, окруженных зоной лецитиназной активности.

Для подтверждения принадлежности обнаруженных микроорганизмов к стафилококкам изучают морфологические, тинкториальные, биохимические свойства не менее чем из 5 колоний. Устанавливают способность коагулировать плазму крови кролика.

Таблица №3.

Микробиологические показатели мяса птицы

Группа продукта	МАФАНМ КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются следующие виды бактерий			
		БГКП	СРК	<i>S.aureus</i>	Патогенные МО, в том числе сальмонеллы
1. Птица охлажденная, замороженная	1×10^5	-	-	-	-
2. Мясо птицы бескостное, кусковое, окорочка	2×10^5	-	-	-	25
3. Потроха (печень, мышечные желудки,	1×10^6	-	-	-	25

Задание для самостоятельной работы:

1. Правильно отобрать пробы мяса и произвести их посев на элективные питательные среды. Сделать заключение о выросших колониях микроорганизмов.

Контрольные вопросы:

1. Как правильно отбирается проба мяса птицы для микробиологического исследования?
2. Методика определения золотистого стафилококка в мясе птицы.
3. Методика индикации БГКП в мясе птицы.
4. Как производится обнаружение сальмонелл в мясе птицы?

ЗАНЯТИЕ №19**Микробиологическое исследование яиц.**

Цель занятия: ознакомить студентов с путями проникновения микробов в яйца; изучить виды порчи яиц; изучить методы микробиологического контроля качества яиц.

Оборудование: куриные яйца разной свежести, овоскоп, стаканы с водой.

Содержание: Яйца от здоровой птицы не содержат микробов и могут оставаться длительное время стерильными. Это связано с тем, что свежие яйца обладают естественным иммунитетом.

Микробы попадают в яйцо не только во время его формирования, но и при хранении. С поверхности яйцо защищено скорлупой, которая имеет поры диаметром от 4 до 10 мкм. Количество пор на 1 см² скорлупы может достигать 100 и более. Через поры микробы проникают внутрь яйца. На скорость проникновения микробов в яйцо оказывает влияние температура, влажность воздуха, степень свежести яиц, инактивация лизоцима, наличие органов передвижения у микробов и т.д.

В содержимом пораженных яиц обнаруживают протей обыкновенного, кишечную палочку и другие микроорганизмы, т.е. те, которые способны передвигаться. Через поры могут проникать плесневые грибы, дрожжи. Белок яйца – хорошая питательная среда для развития микроорганизмов. Чаще поражаются старые яйца, в которых во время хранения понижаются

защитные силы, нейтрализуется лизоцим. Количество лизоцима больше содержится в яичном белке кур (5,71 мг/мл), и меньше в белке водоплавающей птицы: уток (1,80 мг/мл), гусей (до 0,38 мг/мл). Развитие микробов в белке яиц ведёт к порче продукта. У таких яиц при исследовании видны колонии микробов (в виде тёмных точек и пятен).

Находящиеся в яйцах сальмонеллы беспрепятственно размножаются, т.к. лизоцим на них не действует. Наиболее благоприятная часть яйца для развития сальмонелл – желток.

Кроме сальмонелл через поры скорлупы в яйцо проникают холерный вибрион, туберкулёзные бактерии и др.

Особенно опасно яйцо водоплавающей птицы (уток, гусей), оно часто бывает заражено сальмонеллами, микобактериями и другими возбудителями инфекционных болезней, поэтому их разрешается применять только в производстве кондитерских изделий и то после проварки в кипящей воде в течение 13-14 мин.

Проникнув в яйцо, микробы начинают размножаться, образуя в начале колонии на подскорлупной оболочке (амниотическая оболочка), а затем и на белке. Наиболее часто они вызывают гниение и плесневение яиц.

Гниение яиц происходит под влиянием аммонификаторов, которые выделяя протеолитические ферменты, вызывают разложение яичного белка. Образующиеся при этом газы (аммиак, сероводород и др.) нередко разрывают скорлупу, содержимое выливается на соседние яйца, в результате чего происходит их загрязнение и заражение микробами. Содержимое поражённых яиц бывает зелёного, чёрного и реже жёлтого цвета. Из такой массы обычно выделяют микробов из группы *Pseudomonas* и *Proteus*, а также эшерихий, сальмонелл, сенную бациллу, сарцины и др.

Плесневение яиц. Из почвы и загрязнённых предметов на поверхность скорлупы попадают плесневые грибы и актиномицеты. Высокая влажность и температура способствует проникновению в яйцо плесневых грибов. Наиболее благоприятные условия они находят вблизи воздушной камеры. Образующиеся в яйце колонии не пропускают свет (при овоскопии видны тёмные пятна). Таких колоний больше всего около воздушной камеры. Гифы грибов образуют густую сеть, выделяют продукты жизнедеятельности. Белок растворяется, желток остаётся внутри, заключённый в футляр из гиф. Из плесневых грибов чаще всего встречаются представители вида *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* и др.

Свежесть яиц определяют овоскопией или используют пробу с погружением их в воду.

Овоскопия – просмотр яйца в проходящем свете. Для этой цели используют прибор-овоскоп (рис..). Он представляет собой ящик, в верхней части которого имеются отверстия для помещения яиц. Внутри овоскопа должен быть источник света (обычно это электрическая лампочка). Просмотр яиц эффективнее проводить в затемнённом помещении, но при более сильном источнике света. С его помощью устанавливают наличие микробных поражений в яйце. В таких местах можно обнаружить тёмные (задерживающие свет) участки. Они могут быть разные по форме, размерам и представляют собой колонии микробов.

Проба с погружением в воду. Яйцо осторожно погружают тупым концом в стакан с водой. При этом испорченное яйцо стоит на дне или всплывает, свежее – ложится на дно стакана.

Особенности санитарно-микробиологического исследования яиц и продуктов их переработки заключается в одновременном исследовании микрофлоры на поверхности скорлупы и в содержимом яйца.

При микробиологическом исследовании поверхности скорлупы яиц делают смывы, полученные методом использования тампона, методом ополаскивания или методом измельчения.

Общую бактериальную обсемененность поверхности яиц (количество МАФАНМ) определяют общепринятыми методами путем посева 1 мл смыва или его 10-кратных разведений параллельно в две чашки Петри. Которые заливают 15 мл расплавленного и охлажденного до $t +50^{\circ}\text{C}$ МПА, культивируют в термостате 48-72 ч при $t +30^{\circ}\text{C}$. Подсчитывают колонии, выросшие в глубине и на поверхности плотной питательной среды, определяют среднее арифметическое число колоний по двум чашкам одного разведения, умножают на величину разведения и делят на площадь поверхности скорлупы яиц. В результате получают количество микроорганизмов ($\text{КОЕ}/\text{см}^2$) на 1 см^2 скорлупы яиц.

Перед микробиологическим исследованием содержимого яиц поверхность скорлупы обмывают теплым 0,2% раствором каустической соды или 0,5% раствором кальцинированной соды в течение 2 мин. После мойки яйцо ополаскивают водопроводной водой, дают стечь и погружают в 70% спирт на 10 мин, после чего обжигают в пламени.

На остром конце яйца делают отверстие диаметром около 1 см и снова обжигают. Содержимое одного или нескольких яиц выливают в колбу и

гомогенизируют с помощью бус или пипеток до однородной консистенции. Исследование проводят сразу. Для этого 10 мл яичной массы переносят в колбу, содержащую 90 мл стерильного физ. раствора (исходное разведение 1:10), получая разведения 1:100, 1:1000. По 1 мл полученных разведений вносят параллельно в ч.Петри и заливают расплавленным и охлажденным до 50°С МПА.

Для выявления БГКП проводят посев 1 мл натурального продукта и разведений в среду Кесслера, Эндо.

Для индикации сальмонелл 25 мл натурального продукта вносят в колбу, содержащую 25 мл среды обогащения (Кауфмана, магниевой или селенитовой), встряхивают, термостатируют при $t +37^{\circ}\text{C}$ 20 ч. Затем из среды обогащения петлей проводят высев в ч.Петри с ВСА (или средой Плоскирева, Левина), выдерживают 48 ч на среде ВСА и 24 ч на среде Плоскирева и Левина. Из типичных для сальмонелл колоний выбирают не меньше трёх, переносят их в пробирки с МПА, МПБ и на дифференциальную среду Олькеницкого. Выросшие колонии с поверхности дифференциальных сред используют для постановки РА и приготовления мазков.

Таблица №5.

Нормативы микробиологических показателей яиц и яичных продуктов

Группа продуктов	МАФАНМ КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускается наличие следующих бактерий			
		БГКП	S.aureus	протей	сальмонелла
Яйцо куриное, перепелиное, диетическое	5×10^3	0,1	-	-	25
Яйцо куриное. столовое	5×10^5	0,01	-	-	25
Меланж яичный мороженный	5×10^5	0,1	1	1	25

Задание для самостоятельной работы:

1. Произвести овоскопию яиц. Определить свежесть яиц пробой с погружением в воду.

Контрольные вопросы:

4. Какие пути попадания микроорганизмов в яйца?
5. В каких случаях проводят микробиологическое исследование яиц?
6. Как при овоскопировании выглядят испорченные яйца?
7. Как определяют общую микробную обсемененность яиц?

ЗАНЯТИЕ №20

Микробиологическое исследование молока.

Цель занятия: ознакомить студентов с показателями санитарно-бактериологической оценки молока. Дать представление о микробиологических методах исследования сырого и пастеризованного молока.

Оборудование: пробирки со стерильным физиологическим раствором по 9 мл, стерильные чашки Петри, стерильные пипетки на 1 и 2 мл, пробирки с МПА столбиком. Среда Кесслера по 5 мл в пробирках.

Содержание:

Исследование молока и молочных продуктов проводят по ГОСТ 9225-84 «Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа». ГОСТ 13928-84 «Молоко и сливки заготавливаемые. Правила приема, методы отбора проб и подготовка их к исследованию»

Сорт молока зависит от количества МАФАНМ в 1 мл молока, по санитарным правилам и нормам (СанПиН 2.3.2.1078-01) сырое молоко подразделяют на:

- молоко сырое, высший сорт – не более 300 тыс. бактерий в 1 мл;
- молоко сырое, I сорт – не более 500 тыс. бактерий в 1 мл;
- молоко сырое, II сорт – не более 4 млн бактерий в 1 мл.

Для определения количества бактерий в молоке проводят бактериологическое исследование по следующей методике: 1мл сырого молока вносят в пробирку с 9 мл физиологического раствора для первого разведения $1:10$ (10^{-1}), из которого 1 мл переносят во вторую пробирку с 9 мл физиологического раствора и получают разведение $1:100$ (10^{-2}), из третьей пробирки переносят 1 мл в третью пробирку с 9 мл физиологического раствора и получают разведение $1:1000$ (10^{-3}), и так далее, до получения разведения $1:1000000$ (10^{-6}). Из двух последних разведений (10^{-5} и 10^{-6}) по 1 мл вносят в две ч.Петри, каждую заливают расплавленным и охлажденным до $+50-55^{\circ}\text{C}$ МПА, перемешивают легкими вращениями чашек Петри и помещают в термостат на 24-48 ч при $t=37^{\circ}\text{C}$. После чего подсчитывают количество выросших колоний в каждой чашке, определяют

среднеарифметическое число. При этом для подсчета берут те чашки, количество колоний в которых не менее 300 и не более 500.

Число колоний, выросших в каждой чашке, пересчитывают на 1 мл или 1 г продукта с учетом разведения и определяют количество бактерий в 1 мл исследуемого молока.

Задание для самостоятельной работы:

1. Провести бактериологическое исследование сырого и пастеризованного молока.
2. Ознакомиться с демонстрационными посевами молока на средах Симмонса и ГПС, обратить внимание на изменение цвета среды и пузырьки газа в поплавках.

Контрольные вопросы:

1. Каким путем определяют количество МАФАНМ в 1 мл молока?

ЗАНЯТИЕ № 21

Возбудители молочнокислого брожения.

Цель занятия: ознакомить студентов с возбудителями молочнокислого брожения, научить определять наличие посторонней микрофлоры.

Оборудование: набор продуктов молочнокислого брожения: кефир, кефирные грибки, ряженка, кисломолочный напиток «Снежок», ацидофилин, кумыс и др. Микроскопы, метиленовая синька, предметные стёкла, спиртовки, бактериологические петли, сливные чашки, сливные колбы и столики.

Содержание:

Общим признаком всех кисломолочных продуктов является молочнокислое брожение, вызванное молочнокислыми бактериями. Микроорганизмы выделяют фермент – лактазу, расщепляющую дисахарид лактозу на 2 молекулы моносахаридов – глюкозу и галактозу.



лактоза

глюкоза

галактоза

молочная кислота

Таким образом, из одной молекулы сахара лактозы образуется 4 молекулы молочной кислоты. В молоке повышается кислотность, содержащийся в нём казеин свёртывается и образует сгусток.

В некоторых молочнокислых продуктах наряду с молочнокислым брожением протекает и спиртовое брожение. В связи с этим различают следующие виды продуктов:

- продукты молочнокислого брожения: сметана, простокваша, ацидофильное молоко;

- продукты смешанного (молчнокислого и спиртового) брожения: кумыс, кефир, катык и др.

Молчнокислое брожение широко распространено в природе: они обычно находятся в молоке, молочных продуктах, на растениях, в кишечнике животных и человека и почти не встречаются в воде и почве. В зависимости от того, какие продукты образуются при сбраживании сахаров – только молочная кислота или также и другие органические продукты и CO_2 – молочнокислые бактерии подразделяются на гомоферментативные (типичные) и гетероферментативные (нетипичные). К типичным относят те микроорганизмы, которые при сбраживании сахаров образуют в основном молочную кислоту (85-95%) и незначительное количество летучих кислот. Нетипичные микроорганизмы являются слабыми кислотообразователями, наряду с молочной кислотой они образуют количество побочных продуктов (уксусную кислоту, этиловый спирт, диоксид углерода, водород и др.).

Молчнокислые микроорганизмы имеют много общих признаков. Все они факультативные анаэробы, грамположительные, неподвижные, спор и капсул не образуют. Они бывают шаровидной и палочковидной формы.

Гомоферментативные молочнокислые бактерии

Шаровидные формы. Молчнокислый стрептококк (*Streptococcus lactis*) –находится в большинстве молочных продуктов. Он играет важную роль в сквашивании молока и является основной составной частью микрофлоры простокваш. Его клетки имеют овальную форму, которые у молодых культур располагаются в виде коротких цепочек, а у старых – попарно. Хорошо растёт на агаре из гидролизованного молока и молочной сыворотки. На плотных питательных средах образует колонии, разные по форме: поверхностные округлые, глубинные овальные (чечевицеобразные). На сусло-агаре с мелом (САМ) вокруг колоний происходит нейтрализация мела и просветление среды. Оптимальная температура роста 30-35 °С. Через 10-12 ч молочнокислый стрептококк свёртывает молоко; при этом

накапливается около 0,8-1,0% молочной кислоты. Кислотность по Тернеру (градусы Тернера - °Т – количество мл на 0,1 н раствора натрия или калия гидроксида, необходимое для нейтрализации 100мл, или 100 г продукта) достигает 120°С.

Сливочный стрептококк (Str.cremoris) –образует длинные цепочки. Растет так же, как и *Streptococcus lactis*, но кислотность среды ниже (110-115°Т). Оптимальная температура роста 25-30°С. Сгусток на молоке плотный, сметанообразной консистенции, используется при изготовлении заквасок для сметаны, масла, сыров.

Палочковидные молочнокислые бактерии. В эту группу входят болгарская палочка (*Lactobacterium bulgaricum*), ацидофильная палочка (*Lactobacterium acidophilum*), палочка из сыра (*Lactobacterium casei*), палочки из кефира, кумыса и др. Все они тонкие, длинные (до 8-10 мкм) располагающиеся одиночно или в виде цепочек, бесспорные, грамположительные. При окрашивании метиленовым синим, цитоплазма окрашивается неравномерно: наиболее интенсивно краситель воспринимают метакромоновые зёрна. В отличие от шаровидных форм они растут при более высокой температуре (40-45°С) и относятся к термофилам. В среде образуют больше кислоты, чем кокковые формы; её количество достигает 3,0-3,5%. Кислотность по Тернеру 300-400°С. Палочковидные формы на обычных средах не растут. На агаре из гидролизованного молока или молочной сыворотки образуют колонии, напоминающие кусочки ваты или паучков с постепенно суживающимися отростками.

Болгарская палочка (lactobact.bulgaricum) входит в состав болгарской простокваши. Она образует кислоту, является антагонистом гнилостной микрофлоры. Гнилостные микроорганизмы, разлагая белки, образуют ядовитые газы: индол, скатол, аммиак, отравляющие организм и сокращающие человеческую жизнь. Для уменьшения этой микрофлоры необходимо систематическое поступление болгарской палочки в организм.

Ацидофильная палочка (Lactobact.acidophilum) – постоянный обитатель ЖКТ молодняка сельскохозяйственных животных, откуда она и выделяется. Лучше эта палочка приживается в ЖКТ того вида животного, из организма которого она выделена, и проявляет своё действие в течение длительного времени. Ацидофильная палочка образует кислоты больше, чем болгарская и быстрее нейтрализует ядовитые продукты жизнедеятельности аммонификаторов.

Мезофильные бактерии развиваются при температуре 30°C и располагаются цепочкой. Они образуют меньше продуктов жизнедеятельности, кислотность среды, в которой они живут, не превышает 180°Т.

Выделяют два вида стрептобактерий: *Lactobact.casei*, которая принимает участие в созревании сыров, и *Lactobact. Plantarum*, стимулирующая процессы силосования и квашения овощей. Молоко они свёртывают медленно.

Гетероферментативное молочнокислое брожение

Этот вид молочнокислого брожения вызывают такие бактерии, которые кроме молочной кислоты образуют летучие кислоты, ароматические вещества, диоксид углерода и т.д.

Ароматообразующие (*Str.citrovorus*, *Str.paracitrovorus*, *Str.diacetilactis*) придают кисломолочным продуктам приятный вкус и аромат. Среди гетероферментативных молочнокислых стрептококков известны и термофилы – *Str.thermophilus* и др., размножающиеся при температуре около 45°C. Это позволяет использовать их с термофильными молочнокислыми палочками при изготовлении южной простокваши, а также сыров (советский, швейцарский).

Гетероферментативное молочнокислое брожение вызывают представители родов *Leiconostoc*, *Lactobacterium*, *Bifidobacterium*. Бактерии рода *Leiconostoc* имеют вид сферических клеток, располагающихся одиночно, парами или короткими цепочками. Это факультативные анаэробы, неподвижные, гр (+), оптимальная температура роста 20-30°C. Род включает виды *L.mesenteroides*, *L.dextranicum*, *L.citrovorum*.

Род *Lactobacterium* включает виды *L.fermentum*, *L.brevis* и др. Это небольшие палочки, гр (+), температурный максимум около 45°C.

К роду *Bifidobacterium* отнесены бактерии, имеющие прямые или разветвлённые палочки, раздвоенные V-формы, неподвижные, гр (+), анаэробы; температурный оптимум для них 36-38 °С. Бифидобактерии – обитатели кишечника человека и животных. Они сбраживают углеводы с образованием молочной и уксусной кислот, а также биологически активных веществ, которые подавляют гнилостные и патогенные микроорганизмы. Типичный представитель рода – *Bact. bifidum*.

Нетипичное молочнокислое брожение вызывается кишечной палочкой *E.coli* и близкой к ней *E.aerogenes* и другими микроорганизмами. Это мелкие гр (-), в большинстве своём неподвижные, палочки. При сбраживании молока

образуют 40% молочной кислоты, около 20% янтарной, 10% этилового спирта, 10% уксусной кислоты и около 20% газов.

Нетипичные молочнокислые бактерии слабые кислотообразователи. Они свёртывают молоко не менее суток, а в некоторых случаях – даже через неделю. Максимальная кислотность не превышает 100°Т. Сгусток молока слабый, местами разорванный газами. Вкус такого продукта неприятный.

Антагонизм молочнокислых бактерий по отношению к условно-патогенным микроорганизмам обуславливается действием молочной кислоты, которую они продуцируют, а также образованием антибиотических веществ. *Str.lactis* синтезирует низин, *Str.cremoris* – диплококкин, *L.acidophilus* – ацидофилин и лактоцидин, *L.plantarum* – лактолин, *L.brevis* – бревин и др.

Приготовление препарата. Исследуемый кисломолочный продукт (например, сыворотку) микробиологической петлёй наносят на предметное стекло и равномерно распределяют тонким слоем на его поверхности. Препарат высушивают и фиксируют. Фиксировать лучше спирт-эфиром, при этом растворяются капельки жира, улучшается фон. Но можно фиксировать и над пламенем спиртовки. Мазок окрашивают метиленовым голубым в течение 2-3 мин.

Микроскопическая картина: на светло-голубом фоне хорошо видны окрашенные в синий цвет те формы микроорганизмов, которые содержатся в исследуемом материале (рис. 24).

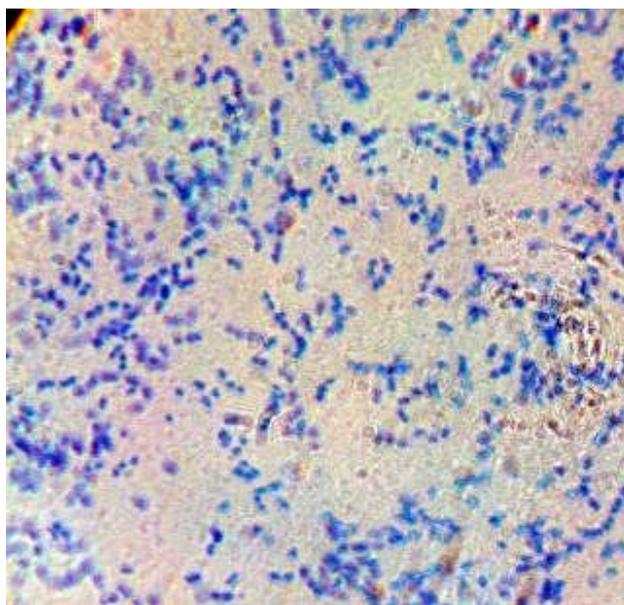


Рисунок 24 – микрофлора кефира. Оригинальный препарат.
Об.90, Ок.15.

Задание для самостоятельной работы:

1. Провести микроскопическое исследование кисломолочных напитков, например, молочной сыворотки, кисломолочного напитка «Снежок» и кефира.
2. Сравнить микроскопические картины между собой и определить, к какому напитку они относятся. Зарисовать в тетрадь.

Контрольные вопросы:

1. В чём разница гомоферментативного молочнокислого брожения от гетероферментативного?
2. Назвать основных возбудителей гомо- и гетероферментативного молочнокислого брожения.

Содержание:

Введение.....	3
ЗАНЯТИЕ № 1. Знакомство с микробиологической лабораторией, техникой безопасности, микроскопом и микроскопией	5
ЗАНЯТИЕ № 2. Питательные среды, техника их приготовления, способы посевов и культивирования микроорганизмов	11
ЗАНЯТИЕ №3. Способы посевов и культивирования аэробных микроорганизмов. Методы выделения чистой культуры.....	23
ЗАНЯТИЕ №4. Методы выделения чистой культуры и культивирования анаэробных микроорганизмов	26
ЗАНЯТИЕ №5. Приготовление бактериоскопического препарата и методы его окраски. Простой метод окраски.....	30
ЗАНЯТИЕ №6. Сложные методы окраски	35
ЗАНЯТИЕ №7. Изучение культуральных свойств микроорганизмов	39
ЗАНЯТИЕ №8. Изучение биохимических свойств микроорганизмов.....	42
ЗАНЯТИЕ №9. Методы стерилизации	48
ЗАНЯТИЕ №10. Морфология плесневых грибов.....	53
ЗАНЯТИЕ №11. Актиномицеты. Морфология дрожжей.....	59
ЗАНЯТИЕ №12. Микробиологическое исследование почвы, воды, воздуха.	62
ЗАНЯТИЕ №13. Микробиологическое исследование кормов.....	69
ЗАНЯТИЕ №14. Пороки мяса микробного происхождения.....	74
ЗАНЯТИЕ №15. Бактериоскопическое исследование мяса сельскохозяйственных животных.	79
ЗАНЯТИЕ №16. Определение количества МАФAnM.....	81
ЗАНЯТИЕ №17. Индикация кишечной палочки и сальмонелл в пробах мяса.	82
ЗАНЯТИЕ №18. Бактериологическое исследование мяса птиц.	85
ЗАНЯТИЕ №19. Микробиологическое исследование яиц.....	89

ЗАНЯТИЕ №20. Микробиологическое исследование молока.	93
ЗАНЯТИЕ № 21. Возбудители молочнокислого брожения.	94
Список рекомендуемой литературы, для изучения дисциплины	
«Микробиология»:	102
Вопросы для выполнения контрольной работы, студентов направления «Ветеринарно-санитарная экспертиза» заочной формы обучения.....	103

Список рекомендуемой литературы, для изучения дисциплины
«Микробиология»

1. Ассонов Н. Р. Практикум по микробиологии. 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1988. – 155 с.
2. Лабораторно – практические занятия по биотехнологии (использование микроорганизмов в биотехнологии) / А.С. Плотников, В.А. Чхенкели, Т. С. Каленская, Д. С. Адушинов. – Иркутск: ИрГСХА. – 2009. – 56 с.
3. Лабораторно-практические занятия по микробиологии. Учебное пособие. 2-е изд. / Сухинин А. А., Тулеева Н. П. Белкина И. В., Смирнова Л. И., Бакулин В. А., Приходько Е. И., Макавчик С. А. – СПб.: Изд-во ВВМ, 2014. – 119 с.
4. Плотников А. С. Лабораторно-практические занятия по ветеринарной микробиологии и иммунологии (учебное пособие). – Иркутск: ИрГСХА, 2002. – 109 с.
5. Руководство по микробиологии и иммунологии / Колычев Н. М. и др.; гл.ред. В.Н. Кисленко. – Новосибирск: Арта, 2010. – 266 с.
6. Санитарная микробиология. Учебное пособие. / Госманов Р.Г., Волков А. Х., Галиуллин А. К., Ибрагимова А. И. – СПб.: Издательство «Лань», 2010. – 240 с.
7. Чхенкели В.А., Мартынова А.Ю. Курс лекций по ветеринарной микробиологии и иммунологии. Учебное пособие. – Иркутск: ИрГСХА, 2011. – 488 с.

Вопросы для выполнения контрольной работы, студентов направления «Ветеринарно-санитарная экспертиза» заочной формы обучения.

1. Предмет «микробиология» и её основоположники
2. Принципы классификации микроорганизмов
3. Основные формы микробов и их величина
4. Строение микробной клетки
5. Химический состав микроорганизмов
6. Процесс спорообразования у бацилл и значение спор
7. Морфология риккетсий, микоплазм, L-форм бактерий
8. Питание микроорганизмов, механизм поступления питательных веществ в микробную клетку
9. Дыхание микроорганизмов, типы дыхания
10. Рост и размножение микробов в природе и на питательных средах
11. Действие физических факторов на микроорганизмы
12. Действие химических факторов на микроорганизмы
13. Генетика микроорганизмов
14. Ферменты микроорганизмов
15. Антибиотики и их продуценты
16. Бактериофаги и их применение в ветеринарии
17. Роль микроорганизмов в круговороте азота в природе
18. Роль микроорганизмов в круговороте серы и железа в природе
19. Сапрофиты и паразиты. Определение понятий «инфекция», «инфекционный процесс» и «инфекционная болезнь»
20. Патогенность, вирулентность. Факторы вирулентности – инвазивность и токсигенность микроорганизмов.
21. Питательные среды
22. Методы выделения чистой культуры.
23. Приготовление бактериоскопического препарата. Простой метод окраски
24. Сложные методы окраски (Окраска по Граму, Пешкову, Михину, Циль-Нильсену)
25. Методы стерилизации
26. Культивирование анаэробов
27. Изучение подвижности микроорганизмов
28. Изучение биохимических свойств микроорганизмов
29. Морфология плесневых грибов (мукор, пеницилл, аспиргилл, актиномикоз, фузариум, тамнидиум, ризопус, альтернария)

30. Морфология дрожжей и их использование в промышленности.
31. Условия возникновения инфекций и значение состояния организма и условий среды в этом процессе.
32. Пути внедрения в организм, распространения в нем и выделение из него микробов. Формы инфекции.
33. Динамика инфекционного процесса
34. Иммунитет и его виды.
35. Неспецифические факторы защиты организма
36. Антигены микробной клетки. Свойства антигенов – антигенность, иммуногенность, специфичность и др.
37. Антитела. Синтез и динамика образования антител.
38. Микрофлора тела животных
39. Микробиологическое исследование воды, воздуха, почвы
40. Микробиологическое исследование яиц
41. Пороки мяса микробного происхождения
42. Способы консервации мяса и микробиологические процессы, происходящие при консервации.
43. Микробиологическое исследование мяса
44. Микробиологическое исследование кормов (силоса, сена, мясо-костной муки)
45. Микробиологическое исследование молока
46. Способы идентификации кишечной палочки, сальмонелл.
47. Гомо- и гетероферментативное молочнокислое брожение. Возбудители молочно кислого брожения
48. Инфекционные заболевания, передающиеся через продукты животного происхождения. Возбудители стафилококкозов
49. Инфекционные заболевания, передающиеся через продукты животного происхождения. Возбудители стрептококкозов
50. Инфекционные заболевания, передающиеся через продукты животного происхождения. Возбудитель мастита
51. Инфекционные заболевания, передающиеся через продукты животного происхождения. Сибирская язва
52. Инфекционные заболевания, передающиеся через продукты животного происхождения. Колибактериозы
53. Инфекционные заболевания, передающиеся через продукты животного происхождения. Сальмонеллезы

54. Инфекционные заболевания, передающиеся через продукты животного происхождения. Бруцеллёз

55. Инфекционные заболевания, передающиеся через продукты животного происхождения. Туберкулёз

56. Инфекционные заболевания, передающиеся через продукты животного происхождения. Ботулизм

57. Инфекционные заболевания, передающиеся через продукты животного происхождения. Листерияоз.

Шифр зачетки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0
1	1, 21,51	2,22,5 2	3,23,5 3	4,26,4 3	5,15,4 5	6,16,3 6	7,27,4 7	8,28,3 8	9,19,4 9	10,20,4 0
2	11,31,4 1	12,32, 42	13,33, 43	14,24, 44	15,25, 35	16,26, 36	17,27, 37	18,28, 38	19,29, 39	20,30,5 0
3	21,31,5 1	22,32, 42	23,33, 53	24,34, 14	25,35, 45	26, 1, 51	27,2,4 7	28,8, 48	29,4,4 9	30,7,40
4	31,2,53	32,3,5 2	33,4,5 1	34,5,5 0	35,6,4 9	36,7,4 8	37,8,4 7	38,9,4 6	39,10, 45	40,1,44
5	41,12,2 3	42,13, 22	43,14, 24	44,15, 25	45,16, 27	46,17, 35	47,18, 29	48,19, 30	49,20, 38	50,21,1
6	51,22,3 5	52,23, 1	53,24, 2	54,25, 36	55,26, 40	56,27, 53	4,28,5 2	5,29,5 1	6,30,5 0	7,31,49
7	8,32,48	9,33,2 1	10,34, 47	11,35, 46	12,36, 19	13,37, 45	14,38, 44	15,39, 18	16,40, 33	17,41,2 6
8	18,42,1	19,43, 2	20,44, 3	21,45, 4	22,46, 5	23,47, 6	24,48, 7	25,49, 8	26,50, 9	27,51,1 0
9	28,52,1 1	29,53, 12	30,1,1 3	31,2,1 4	32,3,1 5	33,4,1 6	34,5,1 7	35,6,1 8	36,7,1 9	37,8,20
0	38,9,21	39,10, 22	40,11, 23	41,12, 24	42,13, 25	43,14, 26	44,15, 27	45,16, 28	46,17, 29	47,18,5 7

