

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

Е. В. Авдеева

САНИТАРНАЯ ГИДРОБИОЛОГИЯ «М1»

учебно-методическое пособие по лабораторным работам (лабораторный
практикум) для студентов,
обучающихся в бакалавриате по направлению подготовки
05.03.06 Экология и природопользование

Калининград
2023

Рецензент

кандидат биологических наук, доцент кафедры водные биоресурсы и
аквакультура ФГБОУ ВО «КГТУ» О.Е. Гончаренок

Авдеева, Е. В.

Санитарная гидробиология «М1»: учеб.-методич. пособие по лабораторным работам для студ. бакалавриата по напр. подгот 05.03.06 Экология и природопользование / **Е. В. Авдеева**. – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВО «КГТУ», 2023. – 41 с.

В учебно-методическом пособии по лабораторным работам по дисциплине «Санитарная гидробиология М1» представлены учебно-методические материалы по подготовке к лабораторным занятиям.

Табл. 3, список лит. - 4 наименования

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. Лабораторная работа № 1. Структура и материально-техническое обеспечение лаборатории микробиологии, общие правила работы в лаборатории. Лабораторное оборудование, применяемое в бактериологических исследованиях	5
Лабораторная работа № 2. Принцип систематизации и классификации микробов	8
Лабораторная работа № 3. Идентификация плесневых грибов	17
Лабораторная работа № 4. Микрофлора воздуха.....	24
Лабораторная работа № 5. Санитарно-микробиологическое исследование воды	30
Лабораторная работа № 6. Идентификация бактерий до рода	35
Заключение.....	39
Список литературы.....	40

ВВЕДЕНИЕ

Учебно-методическое пособие разработано для дисциплины «Санитарная гидробиология», входящей в элективный модуль М1 «Региональная экология» образовательной программы для бакалавриата по направлению подготовки 05.03.06 – Экология и природопользование.

Целью освоения дисциплины является формирование знаний процессов, происходящих в системе функционирования различных форм гидробионтов при активном антропогенном воздействии на водную среду, с санитарными аспектами гидробиологического контроля состояния водоемов и мерами, обеспечивающими сохранение их санитарно-экологического благополучия.

В результате изучения дисциплины студент должен:

знать:

- процессы биологической трансформации основных видов загрязнения водной среды в естественных и промышленных условиях;

уметь:

- оценить влияние санитарного состояния водной среды на эпизоотическое благополучие населения;

владеть:

- навыками определения качества воды с санитарно-экологических, эпизоотологических и эпидемиологических позиций.

1. Лабораторная работа № 1. Структура и материально-техническое обеспечение лаборатории микробиологии, общие правила работы в лаборатории. Лабораторное оборудование, применяемое в бактериологических исследованиях

Цели лабораторного занятия: Бактериологическая лаборатория (её устройство, оборудование, принципы работы). Питательные среды.

План проведения занятия:

1. Определение «чистой» и «заразной» зон.
2. Демонстрация оборудования.
3. Демонстрация питательных сред.
4. Техника безопасности работы в лаборатории.

Оборудование и материалы: термостат, автоклавы, сухожаровой шкаф, бактерицидные лампы, дистиллятор, питательные среды.

Потребность бактерий в кислороде определяют по характеру их роста в столбике РПА. С этой целью исследуемый материал высевает уколом в расплавленный и охлажденный до 40-45 °С РПА. Укол производят по центру до дна пробирки. После инкубации в термостате в течение 48 часов при температуре 37 °С возможны три типа роста: рост в верхней части укола (аэробные микробы), рост в нижней части укола (анаэробные микроорганизмы) и равномерный рост по всей длине (факультативные анаэробы).

Оптимальные температуры роста выявляют путем посева культуры штрихом на скошенный РПА с последующим инкубированием при температурах от 0 °С до 80 °С. В зависимости от наличия и интенсивности роста микроба его относят к мезофилам (рост при температуре 20-48 °С), термофилам (50-80 °С) или психрофилам (от 5 до 20 °С).

Тест на окисление-брожение, или тест Хью-Лейфсона. Этот тест направлен на определение характера использования бактериями данного углевода (обычно глюкозы) путем окисления, путем сбраживания или не используется совсем. Применяемая среда состоит из пептона, агара, NaCl, K₂HPO₄, какого-либо углевода и индикатора (обычно бромтимоловый синий). Для анализа готовят две пробирки со средой, из которой удален воздух. Обе пробирки засевают исследуемым материалом. Затем одну из них с целью создания в ней анаэробных условий заливают стерильным жидким вазелиновым маслом или парафином (слой примерно 1 см). Обе пробирки термостатируют. Кислотообразование (пожелтение среды) в не залитой парафином пробирке указывает, что углевод используется путем окисления, тогда как этот же процесс в анаэробных условиях означает, что углевод используется путем сбраживания.

Отношение к углеводам и пятиатомным спиртам Названные характеристики определяют посевом уколом в полужидкие питательные среды Гисса с углеводами глюкозой, сахарозой, лактозой, мальтозой и маннитом и индикатором (среды могут быть жидкими, со стеклянными поплавками на дне пробирок, заполненными питательной средой). Пробирки термостатируют 2–4 суток (или 7–10 для медленно развивающихся форм). Отмечают визуальные признаки развития микроба и изменение окраски индикатора, а также наличие

пузырьков газа. На основании полученных результатов делают вывод о том, какие углеводы ассимилирует данный микроб и с образованием каких продуктов.

Протеолитические свойства (разжижение желатина). Культуру исследуемого микроба высевают уколом в столбик с РПЖ, инкубируют 4 суток при комнатной температуре. Затем отмечают наличие разжижения и его характер: послойный, воронкообразный, пузырчатый.

Протеолиз казеина. Исследуемую культуру засевают на среду Эндо с молоком. Бактерии, обладающие протеолитической активностью, после термостатирования вызывают просветление вокруг колоний.

Обнаружение аммиака. Высевают исследуемую культуру в РПБ и под пробку укрепляют полоску красной лакмусовой бумаги так, чтобы она не касалась среды. Пробку оборачивают полиэтиленом, чтобы затруднить улетучивание аммиака. Посев термостатируют 2 суток при 37 °С. При образовании аммиака красный лакмус синееет.

Выявление сероводорода. Для обнаружения сероводорода делают посев уколом в среду РПА с 5 % пептона и 0,25 % уксуснокислого свинца. Посев термостатируют 7–10 суток при 37 °С. При наличии сероводорода среда чернеет вдоль укола.

Возможно использование индикаторной бумажки, смоченной раствором уксуснокислого свинца и укрепленной под пробкой в пробирке с посевом в столбик РПА. После термостатирования в течение 7–10 суток бумажка темнеет.

Выявление индола и применяемые реактивы.

Методы выявления:

Метод Мореля. В питательную среду (РПБ + 0,01% триптофана) сеют исследуемую культуру. Затем в пробирку подвешивают индикаторную бумажку, смоченную щавелевой кислотой, так, чтобы бумага не касалась среды. Инкубируют 24 часа при 37 °С. При образовании индола нижняя часть бумаги окрашивается в красный цвет.

Метод Легаль-Вейля. Этот метод наиболее чувствителен. К суточной или двухсуточной бульонной культуре добавляют 5 капель 5%-го раствора нитропруссиды натрия, 5 капель 40%-го раствора NaCl и 7 капель концентрированной уксусной кислоты. В присутствии индола появляется синее-зеленое или темно-синее окрашивание.

Метод Сальковского. К 10 мл исследуемого материала добавляют 1 мл 0,2%-го раствора KNO₂ и несколько капель крепкой серной кислоты. При взаимодействии этих соединений с индолом получается красно-фиолетовое окрашивание.

Выявление с парадиметиламидобензальдегидом. К 10 мл исследуемого материала добавляют 5 мл парадиметиламидобензальдегида и 5 мл насыщенного раствора сульфата калия. При наличии индола возникает интенсивное красное окрашивание.

Применяемые реактивы:

Реактив Нesslera: 20 г KJ растворяют в 50 мл дистиллированной воды и добавляют до насыщения (около 32 г) небольшими порциями AgI_2 ; затем приливают 460 мл воды и вносят 134 г KOH. Отстоявшуюся жидкость сливают в темную склянку.

Приготовление парадиметиламидобензальдегида. 4 г парадиметиламидобензальдегида растворяют в 30 мл 96%-го этилового спирта и добавляют 80 мл концентрированной соляной кислоты.

Определение каталазы. На поверхность колонии микроба, выращенного на плотной питательной среде, наносят каплю 1–3%-го раствора перекиси водорода и прикрывают стерильным покровным стеклом. При наличии каталазы появляются пузырьки газа (атомарный кислород), которые хорошо видны под стеклом.

Выявление способности бактерий восстанавливать нитраты в нитриты.

К 10 мл исследуемого материала добавляют 1 мл раствора Грисса и доводят до кипения. В присутствии нитритов появляется красное окрашивание (т.к. реактив очень к ним чувствителен).

Реакция с цинк-иод-крахмалом. В лунку фарфоровой пластинки вносят 3 капли реактива, каплю 20%-й серной кислоты и каплю исследуемого материала. В присутствии нитритов появляется темно-синее окрашивание.

Приготовление реактива Грисса (состоит из двух растворов). Первый - 0,5 г сульфаниловой кислоты в 150 мл разбавленной уксусной кислоты, второй - 0,1 г α -нафтиламина в 20 мл воды с добавлением 150 мл разбавленной уксусной кислоты.

Цинк-иод-крахмаловая смесь: 4 г крахмала размешивают в небольшом количестве воды, доводят до кипения и при постоянном помешивании добавляют к кипящему раствору хлорида цинка (20 г ZnCl_2 в 100 мл воды). Смесь кипятят до растворения крахмала, добавляют 2 г сухого йодистого цинка и доливают водой до литра. Раствор хранят в темной посуде в темном месте.

Определение интенсивности кислотообразования.

Реакция с метиленовым красным: к жидкой культуре бактерий в среде с углеводом добавляют индикатор метиленовый красный. При интенсивном кислотообразовании окраска культуры меняется на малиновый.

Реакция Фогес-Проскауера (реакция образования ацетилметилкарбинола): к жидкой культуре бактерий добавляют 40% -й раствор KOH. В присутствии ацетилметилкарбинола через несколько минут появляется розовое окрашивание.

Оксидазный тест: материал из исследуемой колонии наносится на фильтровальную бумагу, смоченную реактивом для определения оксидазной активности (30–40 мг α -нафтола непосредственно перед применением растворяют в 2,5 мл спирта-ректификата, добавляют 7,5 мл дистиллированной воды и растворяют 40–60 мг диметилфенилендиамида). Если через 2–4 минуты материал на фильтре посинел - бактерии считаются оксидазоположительными, если окраска материала не изменилась или он порозовел - бактерии

оксидазоотрицательные. Реактив можно нанести непосредственно и на колонию. В этом случае оксидазоположительные колонии оксидазоположительных бактерий синеют или вокруг них появляется синий ободок. Колонии оксидазоотрицательных бактерий не изменяются или розовеют.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ РАБОТЫ.

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

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

Лабораторная работа № 2. Принцип систематизации и классификации микробов

Цели лабораторного занятия: Идентификация бактерий.

План проведения занятия:

1. Изучение культуральных признаков бактерий.
2. Изучение морфологических признаков бактерий
3. Изучение физиолого – биохимических признаков.

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

Сегодня невозможно представить какую-либо сферу жизнедеятельности людей или их профессиональную принадлежность без соприкосновения, прямо или косвенно, с микробами. Последние фактически распространены повсеместно, а их чрезвычайно разнообразный мир устроен не менее сложно, чем мир видимых существ.

При всем множестве и разнообразии микроорганизмов они могут быть объединены в группы (таксоны) на основе сходства (общности) по тем или иным признакам. Отсюда, ***таксон*** - это группа микроорганизмов, обладающих заданной степенью однородности по культуральным, морфологическим, физиолого-генетическим и другим признакам. Теория многообразия микроорганизмов, изучающая отношение между таксонами, получила название ***систематики*** микробов, и само распределение множества микробов по сходным и отличительным признакам в упорядоченные группы (таксоны) принято называть ***классификацией*** микробов; присвоение этим группам научных наименований - ***номенклатурой***.

Весь мир микробов представляет царство, названное прокариотами (Procariotae), которое по совокупности признаков в убывающем порядке

подразделяется на отделы, отделы на классы, классы на порядки, и далее семейства, роды и виды. Каждое наименование в этой иерархии называют таксоном или таксономической категорией. В высший таксон микроорганизмы объединяются по сходству признаков, а в нисходящие таксоны - по отличительным. То есть, высшим таксоном в классификации микробов является царство, а низшим - вид.

Под **видом** имеется в виду группа микроорганизмов, сходных по морфологическим и физиологическим признакам, имеющих единое (общее) происхождение и генотип, и обладающих способностью вызывать в естественных условиях обитания специфические (одинаковые) процессы. Микроорганизмы, выделенные от животного, человека, растения или субстрата внешней среды и выращенные на питательной среде, называют **культурой** (культуры бывают чистыми и смешанными). **Штамм** - культура микроорганизмов одного и того же вида, выделенная из разных сред и отличающаяся незначительными изменениями свойств (чувствительность к антибиотикам, вирулентность или биохимическая активность). Культура микробов, выделенная из одной клетки (потомство одной особи), называется **клоном**.

По международному кодексу номенклатуры бактерий по Берги (1980 г.) виды могут быть разделены на **подвиды** (различия штаммов по некоторым фенотипическим признакам) или **биоварианты** (отклонения штаммов по биохимическим и физиологическим признакам), **сероварианты** (отличия по антигенным свойствам), **патоварианты** (способность вызвать заболевания у определенных хозяев), **фаговарианты** (степень чувствительности к бактериофагам) и **морфоварианты** (отклонения по морфологическим признакам). В противоположность старым синонимам этих названий (биотип, серотип, фаготип или морфотип) названия вариантов предпочтительнее, так как они отражают не типичность, а вариабельность штаммов внутри вида и подвида.

Для обозначения микроорганизмов принята двойная (бинарная) номенклатура, включающая в себя названия рода и вида. Родовое название пишется с прописной буквы, а видовое - со строчной. Например, *Escherichia coli* - кишечная палочка; *Bacillus subtilis* - сенная палочка; *Proteus vulgaris* - вульгарный протей или *Bacillus anthracis* - возбудитель сибирской язвы; *Clostridium chauvoei* - возбудитель эмфизематозного карбункула.

В учебной и научной литературе такие термины, как микроорганизмы, бактерии или микробы, нередко употребляются как синонимы, хотя по сути своей существенно разнятся. Термины «микроб» и «микроорганизм» отражают микроскопические размеры особей и вправе употребляться как аналоги, тогда как бактерии или бациллы несут самостоятельную смысловую нагрузку, отражая палочковидную форму и наличие или отсутствие спорообразования. Поэтому собирательным названием царства невидимых являются термины микробы и микроорганизмы.

Микробы (микроорганизмы) разделены на две большие группировки: *Procariotae* (прокариоты) - обозначает живые микроскопические, лишенные

хлорофилла организмы, или не имеющие в своей структуре отграниченного от цитоплазмы специальной оболочкой (мембраной) ядра; *Eucariotae* - содержат дифференциальное ядро (не считая других отличительных признаков). В первую группу включены бактерии, актиномицеты, спирохеты, риккетсии, цианобактерии, микоплазмы. Группу эукариотов составляют дрожжи, плесневые грибы, микроскопические водоросли и некоторые простейшие.

Таковы основные принципы и особенности систематики и классификации микроорганизмов, а также содержательная часть терминологии, наиболее часто употребляемой в микробиологических дисциплинах.

Термин «идентификация» в переводе с латинского «*identifico*» обозначает отождествление. То есть, речь идет об установлении видовой и вариантной принадлежности микроорганизмов, выделяемых из окружающей среды. Это определение таксономической принадлежности осуществляется путем сопоставления основных, выявленных исследователем признаков у выделенных культур (классификационными признаками микробов, описанных в литературе или определителях). Схема такова: исследователь выделяет микроб в «чистой культуре» - изучает основные характеристики культуры - сопоставляет выявленные признаки с известными таксономическими группами.

Следовательно, идентификация микроба - это заключительный этап любого микробиологического исследования с целью обнаружения микроорганизмов в объектах внешней среды или лабораторной диагностики инфекционной болезни.

Первым шагом идентификации является получение микробов в чистой культуре. В зависимости от изучаемого микроорганизма методы получения чистых культур варьирует от повторных расщепов в чашках Петри на средах общего назначения до выделения изолированных колоний.

Далее описывают культуральные, исследуют морфологические и физиолого-биохимические признаки чистой культуры бактерий. По совокупности всех признаков определяют таксономическую принадлежность бактерии.

Пример. Культуральные признаки: на рыбо-пептонном агаре бактерия образует серо-белую колонию правильной округлой формы. Колония выпуклая, имеет гладкую поверхность, ровный край и выделяет желто-зеленый пигмент, окрашивающий питательную среду.

Морфологические признаки: бактерия имеет форму палочки, по Граму окрашивается отрицательно, спор не образует, подвижна, имеет полярные жгутики. Капсулу не образует.

Физиолого-биохимические признаки: бактерия - аэроб, усваивает органические соединения (гетеротроф), каталазо- и оксидазоположительная, крахмал не гидролизует, но разлагает глюкозу с образованием кислоты без газа в аэробных условиях.

Обратившись к части методических указаний, в которой перечислены таксономические группировки бактерий, находим раздел «Грамотрицательные бактерии», в этом разделе выбираем бесспорные палочки, аэробы, гетеротрофы.

В соответствии с другими физиолого-биохимическими признаками определяем, что выделенная бактерия относится к семейству *Pseudomonadaceae*, род *Pseudomonas*.

Культуральные признаки – это характер роста бактерий на различных питательных средах общего назначения. Учитывают их через сутки после посева и далее в течение недели.

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

При культивировании бактерий на плотных средах (МПА, РПА) учитывают:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

При культивировании бактерий на средах с желатином (МПЖ, РПЖ), помимо характера роста, определяют наличие протеолитических ферментов бактерий.

Учитывают следующие признаки:

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

б) разжижение желатина (чашечкой, воронкой, гвоздем, цилиндром, кратером, чулком, послойное, пузырчатое в глубине, поверхностное);

- в) скорость разжижения (быстро, медленно);
- г) изменение окраски среды (зеленая, синяя и др.).

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

При изучении морфологических признаков описывают форму бактериальной клетки и ее структуры. Морфологические признаки бактерий претерпевают изменения с возрастом культуры, поэтому их изучают у суточных культур. К основным морфологическим признакам относят:

- величину клетки бактерий;
- форму;
- наличие спор;
- наличие капсулы;
- отношение бактерий к окраске по Граму.

Выявляют морфологические признаки микроскопией живых бактерий (методы висячей и раздавленной капли) и окрашенных препаратов.

Традиционным методом окраски бактериальных клеток является метод окраски по Граму. Методика окраски бактериальных культур по Граму. На обезжиренное предметное стекло наносят каплю воды и вносят в нее бактериальную культуру. Растирают культуру в капле воды на площади примерно 4 см². Мазок высушивают на воздухе до полного удаления влаги. Затем мазок фиксируют. Для этого предметное стекло с расположенным сверху мазком проводят трижды через пламя горелки или спиртовки. На остывший мазок накладывают кусочек фильтровальной бумаги и наливают раствор генцианвиолета на 2 мин. Затем бумагу убирают и обрабатывают мазок раствором Люголя в течение 1–2 мин до его почернения. Далее наносят на мазок несколько капель 96%-ного спирта и выдерживают 30 сек. Промывают водой и докрашивают фуксином Циля в течение 2 мин. Промывают водой до чистой капли.

На высушенные окрашенные препараты наносят каплю иммерсионного масла, просматривают под микроскопом (при увеличении объектива микроскопа ×90 или ×100).

В процессе физиологической жизнедеятельности микроорганизмов осуществляется непрерывный обмен веществ микробной клетки с естественной или искусственной средой обитания (окружающая среда, организм человека и животных, питательные среды). Основные физиологические функции клетки заключаются в питании, дыхании, росте и размножении. Определяющее

значение при выборе питательных сред для выделения и идентификации имеют особенности питания и дыхания микроорганизмов.

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

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

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

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

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

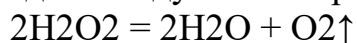
Для определения отношения бактерий к кислороду проводят высев в столбик полужидкой среды (ПЖА, среды Гисса с углеводами и др.). Аэробы растут поверхностной пленкой, факультативные анаэробы – равномерно по всему уколу, облигатные анаэробы – в глубине среды, у дна пробирки, аэротолерантные бактерии рассеиваются по всему столбику среды, микроаэрофильные – в верхней трети среды. На полужидких средах выявляют, кроме того, подвижность бактерий. Подвижные бактерии вырастают на всей поверхности среды или вызывают ее диффузное помутнение, неподвижные – растут строго по уколу.

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

При первичной ориентировочной идентификации выделенных изолятов бактерий используют оксидазный тест. Отбор колоний бактерий для выявления фермента цитохромоксидазы можно осуществить в первичных посевах патологического материала с помощью реактива, состоящего из равных частей 1%-ного спиртового раствора α-нафтола и 1%-го водного раствора

диметилпарафенилендиамина. Для этого часть колонии бактерий снимают бактериологической петлей, переносят на кусочек фильтровальной бумаги и слегка растирают в капле смешанного реактива. Реакцию учитывают в течение трех минут. При наличии оксидазы колония окрашивается в синий цвет, при ее отсутствии – цвет колонии не меняется.

Для целей идентификации грамположительных бактерий проводят тест на наличие каталазы. Это фермент, катализирующий разложение перекиси водорода на воду и газообразный кислород:



Для выявления каталазы на предметное стекло наносят каплю 3,5%-ной перекиси водорода. Вносят в нее бактериологическую петлю с подозрительной колонией и выдерживают несколько секунд. При наличии каталазы вследствие выделения газообразного кислорода колония бактерий начинает «пениться» (выделяются пузырьки газа), при отсутствии каталазы – выделение пузырьков газа отсутствует. Дальнейшая идентификация выделенной культуры бактерий подразумевает проведение теста окисления-ферментации и определения способности бактерий разлагать углеводы. Тест окисления-ферментации (OF-тест). Исследуемую культуру высевает укол в две пробирки со средой Хью-Лейфсона. В одну из пробирок после внесения культуры бактерий наливают стерильное вазелиновое масло слоем не менее 0,5 см. Обе пробирки инкубируют в термостате при температуре, оптимальной для данной бактериальной культуры (как правило, 22–28 °C). В зависимости от включенного в состав среды углевода (обычно глюкозы) определяют способность бактерий осуществлять его разложение. По пробирке без масла определяют окисление (способность бактерий разлагать углеводы в аэробных условиях), по пробирке с маслом – ферментацию (способность бактерий разлагать углеводы в анаэробных условиях). Об окислении или ферментации свидетельствует изменение цвета среды в соответствующей пробирке с травянисто-зеленого на желтый. Возможны четыре варианта разложения бактериями углеводов (на примере глюкозы) на среде Хью-Лейфсона .

Среда Хью-Лейфсона

Состав (г/л):

Пептон	2,0
Натрия хлорид	5,0
Калия гидрофосфат (K_2HPO_4)	0,3
Глюкоза (в растворе)	10,0
Бромтимоловый синий	0,03
Агар-агар	3,0

Ингредиенты растворяют в 1000 мл дистиллированной воды при нагревании. Доводят рН до 7,0-7,2. При необходимости фильтруют. Стерилизуют при 112 °С 20 мин. Среду разливают в пробирки по 4-5 мл. Готовая среда имеет зеленовато-синий цвет. После стерилизации асептически добавляют глюкозу до конечной концентрации 1% (используется 10% стерильный раствор глюкозы). Глюкоза может быть заменена на другие углеводы. Для использования среды готовят стерильное вазелиновое масло.

Среда Хью-Лейфсона предназначена для определения способа утилизации глюкозы или других углеводов у микроорганизмов по аэробному (окисление) и анаэробному пути (ферментация).

Характер разложения бактериями различных углеводов определяют на полужидких средах Гисса, в состав которых входит какой-либо углевод (глюкоза, лактоза, сахароза, мальтоза, маннита, арабиноза, рамноза и др.) и индикатор. В качестве индикаторов могут быть использованы индикатор бромтимоловый синий, индикатор Андреде, индикатор ВР. На среде Гисса учитывают способность бактерий разлагать углеводы до смеси кислот (молочной, уксусной, углекислоты и др.) и газа (H_2 , CO_2). Образование кислоты определяют по изменению цвета среды, образование газа – по ее разрыву, вспениванию или растрескиванию. Посев в среду производят уколом, термостатируют в течение суток. Ферментацию углеводов изучали на среде Гисса с глюкозой. Исследуемые суточные культуры бактерий высевали на данную среду. Желтое окрашивание среды свидетельствовали о расщеплении глюкозы. При образовании газа происходит разрыв и вспенивание среды.

Среда Гисса с углеводами

Состав (г/л):

Панкреатический гидролизат кильки	4,9
Углевод	3,64
Гидроортофосфат натрия (Na_2HPO_4)	0,36
Хлорид натрия (NaCl)	3,64
Бромкрезоловый пурпурный	0,02
Агар микробиологический	2,4

Навеску препарата, указанную на этикетке, размешать в 1000 мл дистиллированной воды, кипятить в течение 2-3 мин. до полного расплавления агара. Среду профильтровать, разлить в стерильные пробирки по 3-4 мл. Стерилизовать автоклавированием 20 мин. при температуре 110°C . Готовая среда имеет фиолетовую окраску, хранится при температуре $5-10^{\circ}\text{C}$ в течение 5 дней.

Среды Гисса предназначены для идентификации различных видов бактерий на основании ферментации ими углевода, входящего в состав среды.

Ход дальнейшего процесса идентификации бактерий определяется отдельно для каждой таксономической группы. Для видовой идентификации штамма бактерий определенного рода необходим набор различных питательных сред и реактивов.

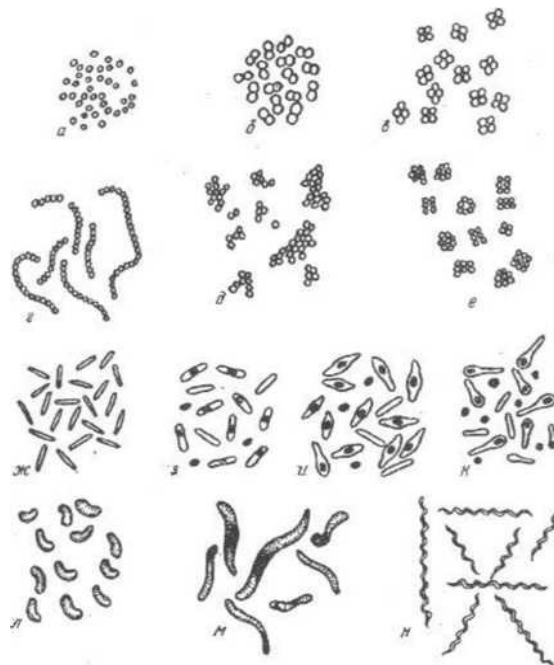


Рисунок 1 – Кокковые и палочковидные формы бактерий: а - микрококки, б - диплококки, в - тетракокки, г - стрептококки, д - стафилококки, е - сарцины, ж - палочковидные бактерии, не образующие спор; з-к - спорообразующие палочковидные бактерии: бациллярного (з), клостридиального (и), плектридиального (к) типа спороношения; л - вибрионы, м - спираиллы, н - спирохеты

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ РАБОТЫ.

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

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

Лабораторная работа № 3. Идентификация плесневых грибов

Цели лабораторного занятия: Изучение культуральных и морфологических признаков плесневых грибов.

План проведения занятия:

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

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

Среди микроскопических грибов имеется немало видов, являющихся возбудителями заболеваний человека и животных. Заболевания, вызываемые грибами, называются микозами. Вегетативное тело гриба представлено мицелием, или грибницей, состоящей из сильно разветвленных нитей – гиф. Гифы грибов бывают одноклеточными с большим числом ядер, представляющих собой одну гигантскую клетку, и многоклеточными, или септированными, то есть разделенными перегородками – септами – на отдельные клетки, содержащие от одного до множества ядер. Гифы большинства грибов, паразитирующих у рыб, не разделены внутренними перегородками. Клетка большинства грибов – это часть гифы, она состоит из хорошо выраженной клеточной стенки и цитоплазмы. В цитоплазме располагаются ядра, мембранные структуры (цитоплазматическая мембрана, эндоплазматическая сеть, аппарат Гольджи), рибосомы, лизосомы, лисосомы, митохондрии, вакуоли. Размножение грибов происходит вегетативным (отдельными участками мицелия или путем деления многоклеточного таллома), бесполом (образование специализированных структур размножения, в которых формируются споры) и половым путем (слияние специальных клеток с последующим объединением или слиянием ядер). Грибы – факультативные паразиты и являются, как правило, возбудителями вторичных инфекций. Возникновение заболевания зависит от патогенности и вирулентности гриба, устойчивости макроорганизма и условий внешней среды. Большинство грибов, возбудителей микозов, поражают органы и ткани рыб, сообщающиеся с внешней средой. Возбудители микозов часто обнаруживаются в свежих очагах некроза тканей, экссудате, полости

плавательного пузыря рыб. К наиболее изученным микозам рыб относятся сапролегниоз, бранхиомикоз, ихтиофноз.

Возбудителями сапролегниоза могут быть грибы из родов *Saprolegnia*, *Achlya*, *Aphanomyces* и другие. Грибы *Branchiomyces sanguinis* выделяют от пораженных бранхиомикозом карпов, а у линей и щук отмечают другой вид гриба – *B. demigrans*. Многие виды рыб поражает грибок *Ichthyophonus hoferi*, вызывая у них ихтиофноз. В настоящее время описаны также грибы *Phoma herbarum*, вызывающие глубокий микоз у форели и других лососевых (ранее заболевание называлось микозом плавательного пузыря). Размягчение оболочки икры лососевых или лопание икры вызывается грибом из класса *Archymycetae*, близким к роду *Rizophidium*. Микологические исследования при диагностике болезней рыб. При постановке диагноза заболевания необходимо исключить или подтвердить его грибковую природу. Микологические исследования проводят в микробиологической лаборатории. Пробы патологического материала для микологических исследований берут асептически от только что погибших или погибших животных. Если пробы сразу обработать невозможно, то их можно хранить в холодильнике в замороженном виде от 1 до 3 суток. Для предохранения проб от загрязнения бактериями их можно консервировать на срок до 1 суток в растворе антибиотиков (пенициллина или стрептомицина) по 100 ЕД на 1 мл раствора.

Подготовка посуды и приготовление питательных сред для проведения микологического исследования основывается на правилах, принятых в микробиологии. Инструменты, посуда, приборы для микологических исследований аналогичны применяемым при бактериологических исследованиях. Методы исследования сходны с методами, принятыми в бактериологии. Патологический материал исследуют микроскопически, выделяют чистую культуру возбудителя, проводят его идентификацию и изучают патогенные свойства (биологическая проба).

Методика микологического посева рыбы. Рыбу извлекают из воды, обездвиживают, осматривают наружные покровы, проводят стерильное вскрытие и отмечают характерные патологоанатомические изменения. При соблюдении правил асептики вырезают пораженные кусочки органов и тканей. Часть отобранного материала помещают на предметное стекло и используют для микроскопии. Другую часть помещают на 20 минут в чашку Петри с раствором антибиотиков (пенициллина, биомицина или стрептомицина по 100 ЕД на 1 мл) или антисептиков (7–10%-ный раствор серной кислоты). Обработанный антибиотиками патологический материал измельчают и переносят асептически на поверхность селективных питательных сред в чашках Петри. Для выявления микроскопических грибов используют агар Сабуро или Чапека. С одного патологического материала делают не менее 5 посевов. Чашки с посевами помещают в термостат при температуре 15–24 °С.

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

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

Полученные чистые культуры описывают по культуральным и морфологическим признакам. Из культуральных признаков микроскопических грибов учитывают размеры колоний, форму, строение края и центра, поверхность (гладкая, пушистая, рыхлая, бархатистая, войлочная, паутинистая, хлопьевидная, мелкозернистая, крупнобугристая и т. д.), консистенцию (плотная, хрупкая, слизистая, порошковидная и т. д.), цвет колоний, пигментацию среды и обратной стороны колоний. Из морфологических признаков учитывают своеобразие ветвления мицелия, размеры и форму конидиеносцев, направление роста и отношение к главной (материнской) гифе, степень ветвления воздушного мицелия (нити 1–3-го порядков), длину и ширину клеток мицелия, характер спорообразования. Все характерные признаки используют для определения семейства, рода, вида гриба с помощью Определителей. Постановка биологической пробы. В том случае, если

выделенный гриб является возбудителем микоза рыб, то проводят биологическую пробу для определения его патогенности. Выбор подопытных рыб при этом должен соответствовать виду и возрасту больных рыб, от которых выделена культура гриба.

Методика постановки биопробы аналогична принятой в бактериологии. Для заражения можно использовать как патологический материал, так и чистые агаровые культуры микроскопических грибов. Патологический материал (пораженные органы и ткани) используют в виде суспензии на физиологическом растворе, обработанной антибиотиками для избегания бактериального загрязнения. Обработку антибиотиками проводят так же, как при микологическом посеве. Суспензии грибов с чистых, агаровых 48–72-часовых культур получают смыыванием спор и мицелия физиологическим раствором. Смывы затем центрифугируют, надосадочную жидкость сливают, а осадок разводят до 1 мл физиологическим раствором. Подсчитывают количество клеток гриба в камере Горяева, затем разводят до получения суспензии с нужным количеством клеток в 1 мл физиологического раствора (от 250 тыс. до 1–2 млн в 1 мл). Для определения патогенности и вирулентности гриба рыб заражают рядом возрастающих доз методами аналогичными, как в бактериологии. Биопроба считается положительной, если рыба заболела и отмечается ее гибель (50 % рыб) с характерными клиническими (изменение поведения и наружных покровов) и патологоанатомическими (абсцессы, гранулемы в органах и тканях) признаками, и если при микроскопическом выделении чистой культуры и гистологическом исследовании патологического материала обнаружены микроскопические грибы в организме рыбы.

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

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

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

При достижении определенного возраста из стелющегося мицелия поднимаются плодоносящие гифы (спорангиеносцы или конидиеносцы), несущие плодовые тела (споры). Споры образуются в особых вместилищах –

спорангиях (эндогенно) и на особых гифах (экзогенно). В последнем случае споры называются конидиями. Конидии образуются на конидиеносцах поодиночке или группами из нескольких конидий, или цепочками, прикрепленными к особым вытянутым клеткам, так называемым стеригмам. Конидии бывают желтые, розовые, бурые, зеленые или совсем бесцветные в зависимости от вида плесени. По строению конидии могут быть одноклеточными или многоклеточными; последние получаются у многих грибов в результате вторичного образования внутренних перегородок.

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

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

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

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

Мукоровые плесени имеют некоторое сходство с дрожжами. Погруженные в питательную среду гифы делятся перегородками, а затем распадаются на ряд округлых клеток (мукоровые дрожжи), способных размножаться почкованием. При нормальных условиях аэрации из мукоровых дрожжей вырастает снова плесневый мицелий. Кроме того, размножение мукоровых грибов происходит путем прорастания спор или частиц мицелия. Иногда размножение протекает и половым путем. При этом на лежащих близко друг от друга гифах появляются раздутые отростки, отделенные от основных гиф перегородками; отростки эти соприкасаются, оболочки в месте соприкосновения растворяются и содержимое сливается в одном общем канале; в центре этого канала образуется зигоспора, имеющая округлую форму с удвоенной оболочкой. Настоящий половой процесс встречается только у грибов, обладающих одноклеточным мицелием, что является характерным для мукоровых плесеней.

Аспергилловые плесени (род *Aspergillus*) имеют многоклеточный мицелий, на котором развиваются неветвящиеся конидиеносцы. На вершущках последних образуются вздутые головки-колонки различной формы, несущие на себе радиально расходящиеся продолговатые отростки, так называемые стеригмы. На стеригмах образуются цепочки конидий различной формы (круглые, грушевидные, эллипсоидальные, гладкие или бородавчатые),

окрашенные в зеленый, бурый, желтый, черный и другие цвета в зависимости от вида плесени.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Дрожжи – одноклеточные, лишённые хлорофилла растительные немикелиальные грибы, относящиеся к классу аскомицетов (сумчатые грибы). Существует большое количество видов дрожжей. Формы дрожжей весьма разнообразные - яйцевидная, эллиптическая, цилиндрическая, лимбовидная и шаровидная. Размер дрожжевых клеток больше, чем бактериальных, и достигает в диаметре 8-10 мкм. Дрожжевые клетки неподвижны и имеют клеточную стенку, цитоплазму и ясно выраженное дифференцированное ядро. У зрелых дрожжей обнаруживаются 1-2 вакуоли различной формы. В цитоплазме имеются разные включения: гликоген, волютин, капли жира. В некоторых дрожжевых клетках может накапливаться до 30-50% жира.

Размножение дрожжей происходит главным образом почкованием, реже спорообразованием и еще реже простым делением. При почковании у зрелой клетки на поверхности клеточной стенки появляется выпячивание – почка, которая постепенно увеличивается. В это выпячивание из материнской клетки переходит часть цитоплазмы и ядра, после чего почка отшнуровывается от материнской клетки и начинает самостоятельное существование. Иногда дочерние клетки не отрываются от материнской, в результате чего образуются большие дрожжевые колонии. При спорообразовании в дрожжевой клетке

образуется 2-4, а иногда 8-12 спор. Дрожжевая клетка в этом случае рассматривается как аскус (сумка), а споры – как аскоспоры.

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

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ РАБОТЫ.

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

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

Лабораторная работа № 4. Микрофлора воздуха

Цели лабораторного занятия:

1. Определени обсемененности воздуха методом Коха.
2. Определение санитарно-показательных микроорганизмов.
3. Оценка санитарно-микробиологического состояния воздуха.
4. Составление протокола исследования.

Оборудование и материалы: чашки Петри с агаром, термостат.

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

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

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

Быстрота движения в воздухе бактериальной пыли определяется интенсивность воздушных вихрей и может колебаться от 0,3 м/мин до 0,3 м/с.

Роль бактериальной пыли состоит в распространении с воздушными течениями тех видов микроорганизмов, которые при высыхании не теряют жизнеспособности (возбудитель туберкулеза, споровые формы).

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

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

Микробиологические нормативы оценки состояния воздуха

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

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

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

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

В настоящее время при исследовании воздуха определяются:

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

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

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

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

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

Таблица 2 - Критерии оценки воздуха жилых помещений

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

Таблица 3 - Критерии оценки микробной обсемененности воздуха в родильных домах

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

Санитарно-микробиологическое исследование воздуха

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

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

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

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

Седиментационный метод. Основан на оседании бактериальных частиц и капель под влиянием силы тяжести на поверхности агара открытых чашек Петри. Их устанавливают в точках отбора на горизонтальной поверхности. Для определения общей микробной обсемененности воздуха чашки Петри с МПА оставляют открытыми на 5-10-15 мин в зависимости от предполагаемого бактериального загрязнения. Инкубацию посевов проводят при 37 °С 24 ч, затем чашки Петри оставляют при комнатной температуре на 48 ч для образования пигмента пигментообразующими бактериями.

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

$$A \times 100 \times 100$$

$$X = \frac{\quad}{\quad}$$

$$75 \text{ см}^2$$

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

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

Определение стафилококков

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

Определение стрептококков

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

1 Состав микрофлоры пробы воздуха М 1 (указать место отбора пробы).

1. Описание культуральных признаков выросших на рыбо-пептонном агаре бактерий и грибов.
2. Расчет обсемененности воздуха, КОЕ/м³.
3. Определение грам-принадлежности экспресс-методом, наличия оксидазы и каталазы всех типов колоний бактерий.
4. Определение грам-принадлежности традиционным способом и описание морфологических признаков всех типов колоний бактерий.
5. Определение родовой принадлежности всех типов выделенных колоний бактерий (по культуральным, морфологическим и биохимическим признакам).
6. Изучение обсемененности пробы воздуха плесневыми грибами (процент плесневых грибов в микробном пейзаже воздуха; определение их родовой принадлежности).

2 Состав микрофлоры пробы воздуха К9 2 (указать место отбора пробы).

1. Описание культуральных признаков выросших на рыбо-пептонном агаре бактерий и грибов.
2. Расчет обсемененности воздуха, КОЕ/м³.
3. Определение грам-принадлежности экспресс-методом, наличия оксидазы и каталазы всех типов колоний бактерий.
4. Определение грам-принадлежности традиционным способом и описание морфологических признаков всех типов колоний бактерий.
5. Определение родовой принадлежности всех типов выделенных колоний бактерий (по культуральным, морфологическим и биохимическим признакам).
6. Изучение обсемененности пробы воздуха плесневыми грибами (процент плесневых грибов в микробном пейзаже воздуха; определение их родовой принадлежности).

3 Состав микрофлоры пробы воздуха К 3 (указать место отбора пробы).

1. Описание культуральных признаков выросших на рыбо-пептонном агаре бактерий и грибов.
2. Расчет обсемененности воздуха, КОЕ/м³.
3. Определение грам-принадлежности экспресс-методом, наличия оксидазы и каталазы всех типов колоний бактерий.

4. Определение грам-принадлежности традиционным способом и описание морфологических признаков всех типов колоний бактерий.

5. Определение родовой принадлежности всех типов выделенных колоний бактерий (по культуральным, морфологическим и биохимическим признакам).

6. Изучение обсемененности пробы воздуха плесневыми грибами (процент плесневых грибов в микробном пейзаже воздуха; определение их родовой принадлежности).

ВЫВОДЫ

1. Сравнить обсемененности микроорганизмами проб воздуха, отобранных в различных экологических условиях.

2. Найти в микробном пейзаже воздуха одинаковые для всех проб микроорганизмы и характерные только для определенной пробы воздуха.

3. Указать, какие санитарно-показательные микроорганизмы встречаются в микрофлоре воздуха:

1. семейство *Enterobacteriaceae*

2. условно-патогенные бактерии родов *Aeromonas*, *Pseudomonas*;

3. бактерии рода *Streptococcus*;

4. бактерии рода *Staphylococcus*;

5. плесневые грибы.

4. Выявить наиболее загрязненные пробы воздуха и объяснить экологические причины этого загрязнения.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ РАБОТЫ.

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

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

Лабораторная работа № 5. Санитарно-микробиологическое исследование воды

Цели лабораторного занятия: Определение степени загрязненности воды.

План проведения занятия:

1. Посев воды

2. Определение обсемененности воды сапрофитными бактериями.

3. Определение обсеменности воды бактериями группы кишечной палочки.

4. Пересев культур на скошенный агар.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Лактозный бульон с борной кислотой готовили следующим образом: на 1000 мл воды брали: пептона- 10 г, двуосновного фосфата калия (безводный, фосфорно-кислый, двузамещенный): K_2HPO_4 - 12,2 г, основного фосфата калия (безводный, фосфорно-кислый, однозамещенный): $KHPO_4$ - 4,1 г, борной кислоты – 3,2—3,5 г, лактозы – 5,0 г, затем растворяли и разливали по 5,0 мл с поплавками в пробирке. Стерилизовали при 0,5 атм. при 112 °С 12 мин. Срок хранения среды - 2 недели. Среду применяли для обнаружения *E.coli*; инкубировали при 43 °С.

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

Затем изучали культуральные, морфологические и биохимические признаки бактерий.

Культуральные признаки – это характер роста бактерий на различных средах общего назначения. Учитывали их через сутки после посева и далее в течение недели.

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

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

Основные морфологические признаки бактерий – величина, форма, спорообразование, капсулообразование, отношение бактерий к окраске по Граму. Морфологические признаки претерпевают изменения с возрастом

культуры, поэтому их принято изучать у суточных культур бактерий при микроскопировании мазка, окрашенного по Граму.

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

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

Определение фермента цитохромоксидазы называется оксидазным тестом: культуру бактерий бактериологической петлей переносили на кусочек фильтровальной бумаги и наносили на него каплю реактива, состоящего из равных частей 1%-го водного раствора диметилпарафенилендиамина и 1%-го спиртового раствора альфанафтола. Оксидазоположительные колонии окрашиваются в синий цвет, оксидазоотрицательные цвета не меняют. Реакцию учитывали в течение 3 мин.

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

Для проведения теста окисления – ферментации готовили среду Хью-Лейфсона. На 100 мл питательного агара брали 1 г глюкозы, 5 г хлорида натрия, 0,03 г калия фосфорнокислого (K_2HPO_4), 0,3 г бромтимолового синего. К расплавленному питательному агару добавляли фосфат калия и глюкозу и кипятили в течение 2-3 мин. С помощью 20%-го раствора едкого натра получали рН 7,4-7,5, доводили объем среды до первоначального и добавляли 0,3мл 1%-го водного раствора бромтимолового синего. Среду фильтровали через ватно-марлевый фильтр, разливали по 4-5мл в стерильные пробирки и стерилизовали при 0,5атм в течение 20мин. Цвет среды до стерилизации синий, после автоклавирования – травянисто-зеленый.

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

Изменение цвета с травянисто-зеленого до желтого свидетельствует об окислении или ферментации. Возможны четыре варианта реакции: окисление и ферментация (цвет среды в обеих пробирках меняется на желтый), окисление глюкозы без ее ферментации (цвет среды менялся на желтый в пробирке без

масла), только ферментация глюкозы (цвет среды менялся на желтый в пробирке с маслом), также бактерии могут не окислять и не ферментировать глюкозу, входящую в состав среды (цвет не меняется в пробирках). Кроме того, бактерии могут расщеплять глюкозу в аэробных условиях с образованием щелочных продуктов, тогда наблюдается синее окрашивание верхней части столбика среды. Посевы инкубировали 4 дня.

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

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

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ РАБОТЫ.

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

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

Лабораторная работа № 6. Идентификация бактерий до рода

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

План проведения занятия:

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

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

Для проведения теста окисления – ферментации готовили среду Хью-Лейфсона. На 100 мл питательного агара брали 1 г глюкозы, 5 г хлорида натрия, 0,03 г калия фосфорнокислого (K_2HPO_4), 0,3 г бромтимолового синего. К расплавленному питательному агару добавляли фосфат калия и глюкозу и кипятили в течение 2-3 мин. С помощью 20%-го раствора едкого натра получали pH 7,4-7,5, доводили объем среды до первоначального и добавляли 0,3мл 1%-го водного раствора бромтимолового синего. Среду фильтровали через ватно-марлевый фильтр, разливали по 4-5мл в стерильные пробирки и стерилизовали при 0,5 атм в течение 20мин. Цвет среды до стерилизации синий, после автоклавирования – травянисто-зеленый.

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

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

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

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

По совокупности культуральных, морфологических и биохимических признаков определяли бактерий до рода с помощью определителя Берджи.

Протокол исследования пробы воды

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

1. - Отмечают последнее разведение, где отмечался рост на МПБ при 37°C.
- Отмечают последнее разведение, где отмечался рост на МПБ при 22°C.
- Отмечают последнее разведение, где отмечался рост на ЛББ при 42°C. Результат теста на свежее фекальное загрязнение воды.

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

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

4. Рост бактерий на псевдосель — агаре.

ВЫВОДЫ:

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

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

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

Таблица - Сравнение по санитарно-микробиологическим показателям качества
поверхностных вод водоемов Калининградской области

Показатели	Речная вода	Озерная вода	Морская вода	Водопроводная вода
Уровень органического загрязнения (микробное число на среде Рябова)				
Присутствие: 1. Бактерий группы кишечной палочки (БГКП) 2. Условно - патогенных микроорганизмов (бактерии родов <i>Pseudomonas</i> , <i>Aeromonas</i>)				
Наличие свежего фекального загрязнения				

Сделать вывод по результатам сравнения качества воды

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ РАБОТЫ.

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

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

Заключение

В ходе проведения лабораторных занятий студенты знакомятся с основами идентификации бактерий по культуральным, морфологическим, физиолого-биохимическим признакам. Изучают методы определения плесневых грибов по культуральным и морфологическим признакам.

Осваивают методы санитарно-бактериологического исследования воды открытых водоисточников, питьевой воды, учатся определять качество воды. Определяют качество воздуха методом Коха, оценивают загрязнённость воздуха по микробиологическим показателям.

Список рекомендуемой литературы

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

Локальный электронный методический материал

Елена Витальевна Авдеева

САНИТАРНАЯ ГИДРОБИОЛОГИЯ «М1»

Редактор И. В. Голубева

Уч.-изд. л. 2,8. Печ. л. 2,6.

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