Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Приморская государственная сельскохозяйственная академия»
Институт животноводства и ветеринарной медицины

Кафедра эпизоотологии, зоогигиены,
ветсанэкспертизы

Микробиология и иммунология

Учебное пособие для проведения лабораторных и самостоятельных работ для обучающихся по направлению подготовки 36.03.02 Зоотехния всех форм обучения

Электронное издание

Уссурийск, 2018

УДК 619

Бусарова О.Ю., Фролова Н.С. Микробиология и иммунология: учебное пособие для проведения лабораторных и самостоятельных работ для обучающихся по направлению подготовки 36.03.02 Зоотехния всех форм обучения [Электронный ресурс]: / О.Ю. Бусарова, Н.С. Фролова; ФГБОУ ВО ПГСХА. – Электрон. текст. дан. – 2-е изд., перераб. и доп. – Уссурийск: ПГСХА, 2018. – 130 с. – Режим доступа: http:// www.de.primacad.ru

Рецензент: Ю.А. Колина, к.б.н., доцент кафедры морфологии и физиологии

Электронное издание

Издается по решению методического совета ФГБОУ ВО Приморская ГСХА

ВВЕДЕНИЕ

Для качественного обучения будущих специалистов-зоотехников представляется совершенно необходимым приобретение достаточных знаний в области микробиологии.

Дисциплина «Микробиология и иммунология» является одной из фундаментальных наук, которая изучает организмы, невидимые невооруженным глазом. Микроорганизмы или микробы распространены во всех сферах биосферы. Они играют огромную роль в круговороте биогенных веществ. Некоторые микробы являются возбудителями опасных инфекционных заболеваний животный, в том числе, и сельскохозяйственных, и человека, которые часто могут вызывать и гибель организмов. Так же есть и полезные для человечества микроорганизмы - симбионты, живущие в желудочно-кишечном тракте, которые оказывают неоценимую пользу для макроорганизма. Большое количество видов используется в сельском хозяйстве, медицинской и пищевой промышленности: для приготовления высокопитательных кормов, пищевых продуктов, лекарств.

Для высокого качества обучения будущих специалистов-зоотехников курс «Микробиологии и иммунологии» включает не только лекции, но и лабораторные работы. Темы лабораторных занятий разработаны таким образом, чтобы обучающийсяы могли приобрести навыки работы в микробиологической лаборатории, разобрать и более детально изучить некоторые вопросы теоретического курса. В процессе изучения предмета у обучающийсяов складываются определенные представления о микроорганизмах, об их роли в природе и в сельскохозяйственной отрасли. Знакомство со строением, культуральными, биохимическими и другими свойствами микробов помогут зоотехнику правильно, осмысленно подойти

к использованию многих положительных свойств этих существ на практике.

Задача дисциплины - обучение будущих зоотехников основным манипуляциям проводимых на практике, связанных с миром микроорганизмов.

В результате полного освоения курса дисциплины будущий специалист сможет самостоятельно на практике или производстве применить знания об микроорганизмах: самостоятельно приготовить питательную среду, сделать посев исследуемого материала, вырастить колонии микробов, сделать предварительную оценку состава исследуемого микробиологического сообщества.

Цель данного методического пособия: ознакомление обучающихся с основными манипуляциями, применяющимися для изучения микроорганизмов; получение представления об иммунологических реакциях и их применении, а так же о некоторых микроорганизмах – возбудителей опасных заболеваний.

Лабораторные работы выполняются согласно учебному пособию. Для выполнения лабораторных работ обучающийся получает необходимое оборудование и самостоятельно выполняет работу согласно плану, с соблюдением необходимой техники безопасности, при необходимости получает консультацию у преподавателя. Работа считается выполненной если:

- обучающийся выполнил все задания
- осмыслил теоретический материал
- аккуратно оформил лабораторную работу
- сформировал правильные выводы и дал письменные ответы на контрольные вопросы
- защитил работу

Лабораторная работа № 1

Тема: Правила работы и техника безопасности при работе в лаборатории. Методы исследования микроорганизмов. Виды микроскопии. Устройство микроскопа

Цель занятия: Усвоить правила работы в бактериологической лаборатории. Ознакомиться с техникой безопасности и личной профилактики. Освоить работу с микроскопом, в особенности с иммерсионным объективом.

Материалы и оборудование: Микроскоп, набор готовых окрашенных препаратов-мазков, таблицы микроорганизмов.

Порядок выполнения работы:

1. Изучить и законспектировать теоретический материал;
2. Рассмотреть устройство микроскопа, и зарисовать рисунок в тетради;
3. Настроить освещение микроскопа;
4. Рассмотреть готовый бактериологический материал с помощью иммерсионного объектива;
5. Сделать вывод по проделанной лабораторной работе.

Теоретический материал

Ветеринарная бактериологическая лаборатория – это учреждение Государственной ветеринарной службы, деятельность которой направлена на обеспечение развития животноводства, предупреждение и ликвидацию заразных болезней и падежа животных, а так же на охрану населения от болезней, общих для животных и человека.

Задача бак. лаборатории – диагностика болезней с/х животных, птиц, пушных зверей, рыб, пчел, и проведение экспертизы молока, мяса, кормов и других пищевых продуктов.

Правила работы и техника безопасности в бак. лабораториях:

- в помещении находиться только в халате, и желательно в белой шапочке;
- не вносить посторонние вещи, продукты;
- сумки складывать в специально отведенном месте;
- не есть;
- перед началом работы проверять наличие и исправность приборов;
- не зажигать одну горелку от другой, пользоваться только спичками;
- соблюдать опрятность в работе;
- соблюдать осторожность при распаковке пат. материала;
- материал, используемый на учебных занятиях рассматривают как особо опасный;
- вскрытие трупов животных проводят в специальной одежде на оборудованном столе специальными инструментами. После вскрытия инструменты класть только в дез. раствор;
- жидкости переливают над сосудом с дез. раствором;
- если пат. материал попал на стол, то его немедленно удаляют тампоном, смоченном в дез. растворе;
- по окончании работы пат.материал, использованные культуры микроорганизмов, инструменты и поверхность стола обеззараживают;
- обучающийсям не выносить из лаборатории пробирки, препараты и др.;
- перед уходом из лаборатории необходимо снять халат, вымыть руки, выходить из лаборатории в халатах запрещается.

Микробиологические методы исследования включают:

1) микроскопирование, 2) выделение и изучение культуральных и биохимических свойств чистой культуры возбудителя болезни, 3) определение патогенности микробов (заражение животных), 4) серологическую идентификацию и серологическую диагностику.

Для проведения микроскопирования используют микроскопы (световые, люминесцентные, электронные).

Световой микроскоп (рис. 1) состоит из двух основных частей: механической (штатив, предметный столик, тубус с «револьвером», макро- и микровинты) и оптической (осветительный аппарат, объективы и окуляр).

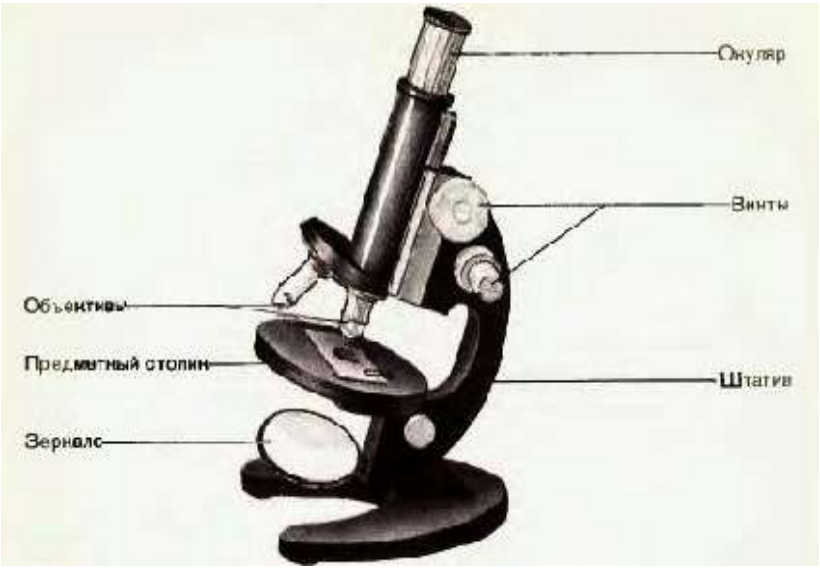


Рис. 1 Устройство оптического микроскопа

Оптическая часть включает 1) осветительный аппарат, 2) объективы, 3) окуляр.

1) осветительный аппарат расположен под предметным столиком, состоит из зеркала и конденсора с диафрагмой. Зеркало направляет световые лучи, оно имеет две поверхности – плоскую (при дневном свете) и вогнутую (при искусственном источнике света). Конденсор – собиратель световых лучей, состоит из двух линз: верхней плосковыпуклой и нижней – двояковыпуклой. Световые лучи, отраженные зеркалом, собираются конденсором в фокусе на уровне рассматриваемого препарата. Для уменьшения освещенности поля зрения конденсор опускают, для увеличения доступа света – поднимают. Диафрагма прикреплена к нижней части конденсора, состоит из полукружных металлических пластинок, которые с помощью рычажка сдвигаются и раздвигаются, регулируя доступ света.

2) объектив ввинчивается в нижней части тубуса в отверстие «револьвера», состоит из нескольких линз, закрепленных в металлический футляр. Наружная линза называется фронтальной. Обеспечивает увеличение объекта. Сухие объективы: между фронтальной линзой и препаратом имеется прослойка воздуха, световые лучи, проходящие через стекло препарата, попадают в воздушную прослойку, преломляются и полностью не попадают на объектив, при этом освещенность поля зрения незначительна. Погруженный (иммерсионный) объектив предотвращает рассеивание луча света, используется для увеличения освещенности. На препарат наносят иммерсионное масло (кедровое), и в него погружают фронтальную линзу под контролем глаза (смотреть сбоку!). Образуется оптически однородная среда, световые лучи не рассеиваются, хорошо освещая поле зрения.

3) окуляр находится в верхней части тубуса, состоит из верхней глазной и нижней собирательной линз, заключенных в металлический цилиндр. Окуляр увеличивает изображение, данное объективом.

Правила работы с микроскопом

Конденсор поднят до уровня предметного столика, диафрагма открыта. Тубу приподнят, объектив с наименьшим увеличением (8, 10 раз). С помощью вращения зеркала добиться полного освещения поля зрения. На препарат нанести каплю иммерсионного масла, установить на предметном столике. Установить иммерсионный объектив. Под контролем глаза (смотреть сбоку) фронтальную линзу погрузить в масло, **макро**винтом слегка приподнять тубус до видимости. Отрегулировать видимость **микро**винтом. После работы: приподнять тубус, «револьвер» в нейтральное положение, масло снять с линзы хлопчатобумажной тканью, микроскоп накрыть и убрать в шкаф.

Вопросы для самоконтроля:

1. Каковы назначение и задачи бактериологической лаборатории?

2. Какие правила работы с патологическим материалом Вы знаете?

3. Какие предъявляют требования к одежде при работе в бактериологической лаборатории?

4. Каково устройство осветительной части микроскопа?

5. Каково назначение фронтальной линзы?

6. Каково назначение конденсора и диафрагмы?

7. Каковы правила работы иммерсионной системы?

Лабораторная работа № 2

Тема: Морфология бактерий. Приготовление бактериальных препаратов. Простой метод окраски.

Цель занятия: Ознакомиться с микробиологическими красками и красящими растворами. Овладеть методикой приготовления мазка-препарата и методикой простого окрашивания. Изучить морфологию бактерий.

Материалы и оборудование: спиртовка, предметные стекла, р-р фуксина, метиленовой сини, спирт. Таблицы - методы окраски бактерий, пробирки с бактериологическими культурами.

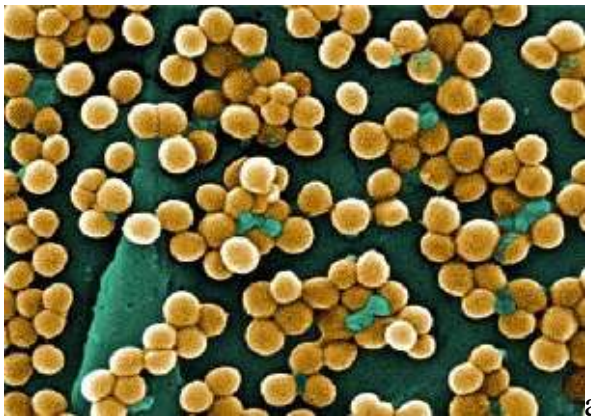
Порядок выполнения работы:

1. Изучить и законспектировать теоретический материал;
2. Рассмотреть с помощью таблиц основные формы бактерий;
3. Приготовить бактериологический препарат;
4. Окрасить мазок простым способом;
5. Рассмотреть мазок с помощью иммерсионного объектива;
6. Увиденную картину зарисовать в рабочей тетради;
7. Сделать вывод по проделанной лабораторной работе.

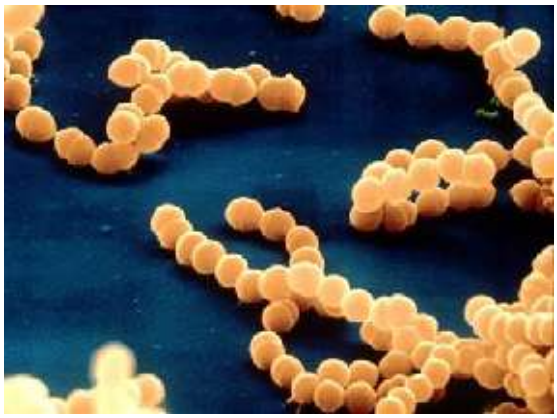
Теоретический материал

Морфология бактерий. По форме клеток выделяют 3 группы: 1. *Кокки* (рис. 2) (чаще шаровидные), в зависимости от расположения клеток они делятся на: микрококки (делятся в разных плоскостях и располагаются одиночно, парами или беспорядочно); стафилококки (беспорядочно расположенные клетки, иногда образующие скопления в виде «грозди винограда»); диплококки (располагаются попарно); тетракокки (располагются вместе по 4 кокка); стрептококки (располагаются в виде цепочек); сарцины (образуют правильные пакеты по 8-16 клеток и более). *2. Палочковидные бактерии* (рис. 3) подразделяются на собственно

бактерии и бациллы (могут образовывать спору). 3. *Извитые бактерии* (рис. 4) подразделяются на вибрионы, спириллы и спирохеты.

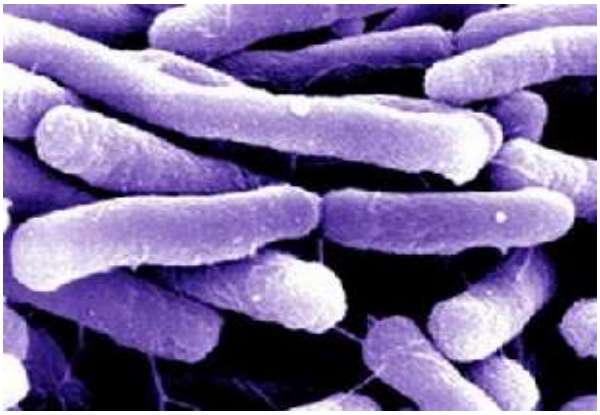


а)



б)

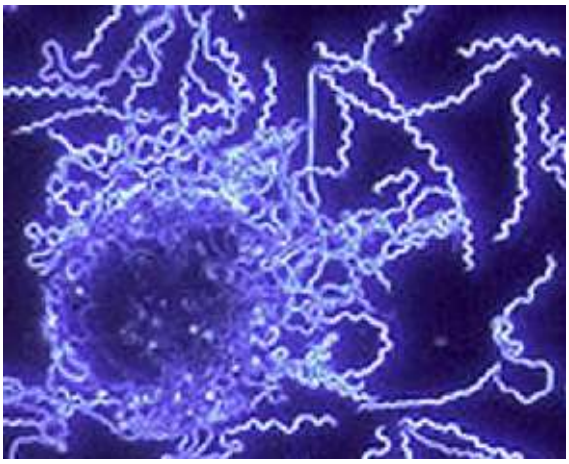
Рис. 2. Кокки (макрофото): а) стафилококки; б) стрептококки



а)

б)

Рис. 3 Палочковидные бактерии: а) собственно бактерии; б) бациллы



а)

б)

Рис. 4. Извитые бактерии: а) спирохеты; б) вибрионы

Техника приготовления бактериальных препаратов для микроскопирования

1. Пробирку со взвесью бактерий держат в левой руке, в правой – бактериологическую петлю (как карандаш), прожигают ее над пламенем горелки и не выпуская из рук, открывают пробирку свободными пальцами правой руки. Петлей захватывают каплю материала, пробирку закрывают, ставят в штатив.

2. Левой рукой берут предметное стекло за «края», наносят на его поверхность каплю и круговыми движениями растирают по стеклу. Можно добавить каплю физраствора. Препарат высушивают на воздухе, петлю прожигают.

3. Высушенный мазок *фиксируют* (наз. протрава). Физическая фиксация: препарат обратной стороной мазка 2-3 раза слегка проводят над пламенем горелки. Химическая фиксация: высушенный мазок помещают в стаканчик с фиксирующей жидкостью (эфир, спирт, формалин и их сочетания), или 1-2 капли фиксатора наносят на препарат. Выдерживают 3-5 мин. Мазок промывают, высушивают фильтровальной бумагой.

Простой метод окраски позволяет быстро ознакомиться с морфологией бактерий. Для окраски используют какой-либо один красящий раствор. На фиксированный мазок, помещенный на «мостик» над сливной чашей, наносят раствор красителя. Метиленовым синим окрашивают 4-5 мин, геацинвиолетом – 1-2 мин, раствором фуксина 1-2 мин. Краску смывают водой из бутыли, мазок высушивают фильтровальной бумагой. На готовый мазок наносят каплю иммерсионного масла, микроскопируют.

Вопросы для самоконтроля:

1. Какие основные формы бактериальных клеток Вы знаете.
2. Какова методика приготовления препарата – мазка?
3. В чем суть фиксации? Какие виды фиксации Вы знаете?

4. Какие простые красители применяются в микробиологической практике?

Лабораторная работа № 3

Тема: Сложные методы окраски: окраска по Граму

Цель занятия: Овладеть методикой окрашивания бактериальных препаратов по Грамму. Ознакомиться с модификациями окраски по грамму.

Материалы и оборудование: растворы фуксина и метиленовой сини, спирт, раствор Люголя., таблицы дифференциации бактерий по отношению к окраске по Грамму, пробирки или чашки Петри с бактериологическими культурами, спиртовка, предметные стекла, бактериологические петли, фильтровальная бумага, фильтровальная бумага, пропитанная раствором кристалвиолета.

Порядок выполнения работы:

1. Изучить и законспектировать теоретический материал;
2. Приготовить бактериологический препарат;
3. Окрасить препарат по Грамму;
4. Рассмотреть мазок с помощью иммерсионного объектива;
5. Увиденную картину зарисовать в рабочей тетради;
6. Сделать вывод по проделанной лабораторной работе.

Теоретический материал

Окраска препаратов-мазков по Грамму используется для дифференциации бактерий. Различают грамположительные и грамотрицательные бактерии (табл. 1).

Практическое значения окрашивания мазков-препаратов по Грамму: оценка свежести мяса и мясных продуктов, выявление мяса больных животных, экспертиза солонины и солено-копченых изделий, оценка свежести рыбы.

Сущность метода: *грамположительные* бактерии прочно фиксируют комплекс генцианвиолета и йода, не обесцвечиваются этанолом, и не

воспринимают дополнительный краситель фуксин, оставаясь окрашенными в фиолетовый цвет. У *грамотрицательных* бактерий этот комплекс легко вымывается этанолом, и после нанесения фуксина окрашиваются в красный цвет. Это обусловлено, прежде всего, различным содержанием пептидогликана в клеточных стенках бактерий. У грамположительных бактерий – 50-90% пептидогликана, у грамотрицательных – 1-10%. Пептидогликан образует каркас с порами. Поры у грамотрицательных бактерий шире, и поэтому первый краситель легко вымывается этанолом, и они окрашиваются только в цвет второго красителя (красный). У грамположительных бактерий пептидогликановый слой более плотный, поры узкие, поэтому цвет первого красителя (фиолетовый) очень плохо вымывается этанолом, и окраски вторым красителем (красным) не происходит.

Этапы окрашивания:

1. Генцианвиолет (или кристалвиолет) и нуклеиновые кислоты цитоплазмы в присутствии Йода (раствор Люголя) образуют прочный комплекс, нерастворимый в воде и слабо растворимый в этаноле. Все бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет.

2. Этанол вымывает из клеточной стенки грамотрицательных бактерий фиолетовый краситель, обесцвечивая их. Грамположительные бактерии сохраняют фиолетовую окраску.

3. Краситель фуксин (розовый/красный) проникает в пустые поры клеточной стенки обесцвеченных грамотрицательных бактерий, окрашивая их в розовый/красный цвет. Грамположительные бактерии не окрашиваются.

Существует несколько модификаций метода окраски по Грамму: Модификация Синева, Калины, Берга, Хукера, по Керри.

Метод окраски по Грамму (модификация Синева)

1. На фиксированный мазок кладут полоску фильтровальной бумаги, пропитанной генцианвиолетом и на нее наносят 2-3 капли воды, окрашивают 2-3 мин.

2. Снимают бумажку и не промывая водой наносят несколько капель раствора Люголя на 2 мин.

3. Раствор Люголя сливают и обрабатывают спиртом 30сек.

4. Препарат промывают водой.

5. Наносят несколько капель фуксина и окрашивают 1-2 мин, промывают водой.

6. Препарат сушат фильтровальной бумагой.

7. Наносят 1 каплю иммерсионного масла и микроскопируют при объективе 90.

Табл. 1. Дифференциация бактерий по отношению к окраске по Граму.

ТОНКОСТЕННЫЕ, ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ		ТОЛСТОСТЕННЫЕ, ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ	
Менингококки		Пневмококки	
Гонококки		Стрептококки	
Вейлонеллы		Стафилококки	
Палочки		Палочки	
Вибрионы		Бациллы*	1 2 3
Кампилобактерии, Хеликобактерии		Клостридии*	1 2 3
Спириллы		Коринебактерии	
Спирохеты		Микобактерии	
Риккетсии		Бифидобактерии	
Хламидии		Актиномицеты	

*Расположение спор: 1 – центральное, 2 – субтерминальное, 3 – терминальное.

Вопросы для самоконтроля:

1. В чем отличие сложного способа окрашивания от простого?

2. В какой цвет окрашиваются грамположительные бактерии?

3. В какой цвет окрашиваются грампотрицательные бактерии?

4. Каково практическое значений окраски по Граму?

5. Для чего во время окрашивания используют этанол?

Лабораторная работа № 4

Тема: Сложные методы окраски: окраска спор

Цель занятия: Ознакомиться с методами окрашивания спор. Овладеть методикой окрашивания спор по Златогоровой и Пешкову.

Материалы и оборудование: бактериальная культура, феноловый фуксин Циля, 5% раствор серной кислоты, метиленовая синь, метиленовая синька Леффлера, 1% водный раствор нейтральрота, фильтровальная бумага, вода, спиртовка, световой микроскоп, предметные стекла, бактериологическая петля, сливная чаша.

Порядок выполнения работы:

1. Изучить и законспектировать теоретический материал;
2. Приготовить бактериологический препарат;
3. Окрасить препарат по методу Златогоровой, Пешкова или Ожешко;
4. Рассмотреть мазок с помощью иммерсионного объектива;
5. Увиденную картину зарисовать в рабочей тетради;
6. Сделать вывод по проделанной лабораторной работе.

Теоретический материал

Споры бактерий представляют собой бактериальные клетки в состоянии анабиоза и образуются при неблагоприятных условиях внешней среды. В процессе спорообразования клетка почти полностью теряет воду, сморщивается, клеточная стенка уплотняется. Появляется новое вещество - дипиколинат кальция, которое образует комплексы с биополимерами клетки, устойчивые к действию температуры и ультрафиолетовых лучей. В окружающей среде споры бактерий могут сохраняться годами, но при попадании в благоприятные условия спора впитывает влагу, комплексы распадаются, дипиколинат разрушается, и спора превращается в вегетативную клетку (рис. 5).

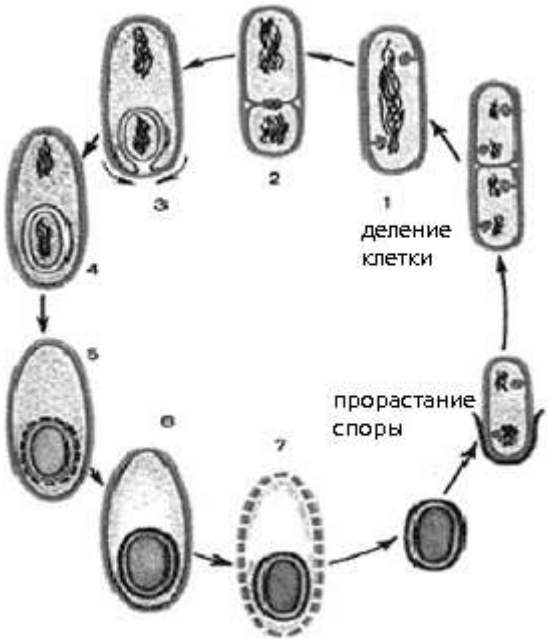


Рис. 5. Жизненный цикл спорообразующих бактерий

Эндоспоры образуют бактерии родов Bacillus, Clostridium, некоторые виды родов Micrococcus, Sarcina. Зрелые споры имеет вид блестящих, плотных, сильно преломляющих свет телец, округлой, овальной, продолговатой, элепсовидной, цилиндрической формы (рис. 6).

Рис. 6. Строение споры

Типы расположения спор в теле клетки (рис. 7)

- центральное, спора в центре клетки, не вызывая ее изменение (*Bacillus antracis*);

- эксцентральное (субтерминальное), спора несколько сдвинута к полюсу клетки;

- полярное (терминальное), спора занимает полярное положение в клетке, т.е. на полюсе;

- клостридиальное, спора в ценрте клетки, превышает ее диаметр, образуя вид веретена (*Clostridium pasteurianum*);

- плектридиальное, спора на полюсе, превышая размер клетки, и придает вид барабанной палочки, теннисной ракетки (*Clostridium tetani*).

Рис. 7. Типы расположения спор в теле клетки

Споры обладают устойчивостью к высушиванию, нагреванию, к обработке кислот и щелочей, что объясняется особым строением и химическим составом споры, в особенности ее оболочки. Споры стойки к действию красителей.

Для окраски спор применяются специальные сложные методы, которые основаны на обеспечении проникновения красителя через трудноокрашиваемую оболочку споры. Применяют протраву (хромовая кислота разрыхляет оболочку), а подогревание делает ее более проницаемой для горячего фуксина с протравителем фенолом. После

охлаждения оболочка вновь становиться плотной, не пропускает серную кислоту и дополнительный краситель (рис. 8).

Окраска спор по методу Златогорова

1. Мазок фиксируют над пламенем горелки;
2. На поверхность мазка кладут фильтровальную бумагу, окрашенную феноловым фуксином Циля. Бумагу смачиваю 3-5 каплями воды;
3. Препарат подогревают на спиртовой горелке в течение 5-7 мин. Чтобы мазок не высыхал во время испарения добавляют по каплям воду;
4. Не смывая водой, мазок обрабатывают 5% раствором серной кислоты в течение 5-10 сек;
5. Препарат промывают водой;
6. Препарат окрашивают метиленовой синью 2-4 мин;
7. Мазок промывают водой и высушивают фильтровальной бумагой;
8. Мазок микроскопируют.

Микрокартина: споры окрашиваются в розово-красный цвет, вегетативные клетки – в синий.

Окраска спор по методу Пешкова

1. На фиксированный мазок кладут полоску фильтровальной бумаги и наносят несколько капель метиленовой синьки Леффлера;
2. Мазок подогревают над пламенем спиртовки до появления паров в течение 10-20 сек;
3. Мазок остужают, промывают водой и докрашивают 1%-м водным раствором нейтральрота (нейтральный красный) в течение 10 сек;
4. Мазок промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой;
5. Мазок микроскопируют.

Микрокартина: споры окрашиваются в синий цвет, вегетативные клетки в красный (розовый).

Окраска спор по методу Ожешко

1. Препарат высушивают на воздухе;

2. На нефиксированный мазок наливают 0,5% раствора соляной кислоты и подогревают на пламени до появления паров;

3. Сливают кислоту;

4. Промывают водой и сушат на воздухе;

5. После высыхания мазок фиксируют на пламени и остужают;

Фиксированный препарат красят по способу Циля-Нильсена:

6. На мазок кладут кусочек фильтровальной бумаги;

7. Наливают фуксин Циля и нагревают на пламени горелки до появления паров, оставляют краситель, пока препарат остынет;

8. Снимают бумажку с фуксином, ополаскивают водой;

9. На препарат наносят 5% раствор серной кислоты на 30 сек;

10. Промывают водой;

11. Докрашивают метиленовым синим в течение 2-х минут;

12. Смывают водой и высушивают.

Микрокартина: Споры принимают ярко-красный цвет фуксина. Вегетативное тело бактерии, обесцвеченной серной кислотой, окрашивается дополнительной краской в синий цвет.

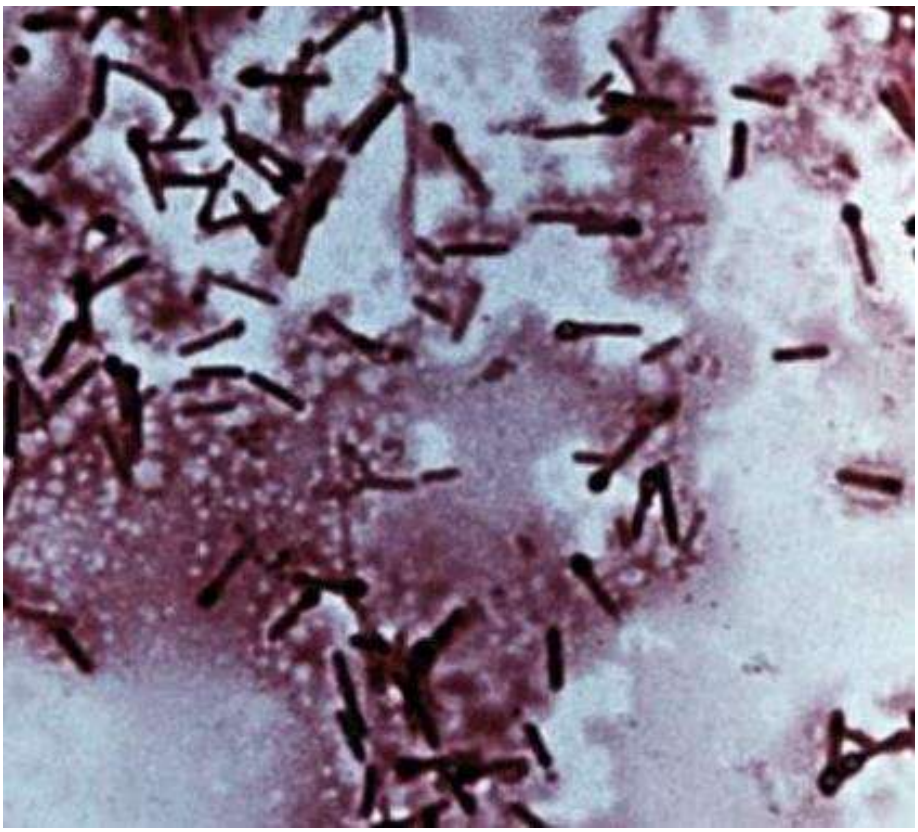


Рис. 8. Окрашенные споры (микроскопическая картина)

Вопросы для самоконтроля:

1. В чем особенность окрашивания спор бактерий?
2. Какие типы расположения спор в бактериальной клетке?
3. Для чего у бактерий образуются споры?
4. Какие методы окраски спор Вы знаете?

Лабораторная работа № 5

Тема: Определение подвижности у бактерий

Цель занятия: Усвоить методы определения подвижности у бактерий.

Материалы и оборудование: бактериальная культура, предметные стекла, специальные предметные стекла с луночкой, покровные стекла, световой микроскоп, бактериологическая петля, сливная чаша.

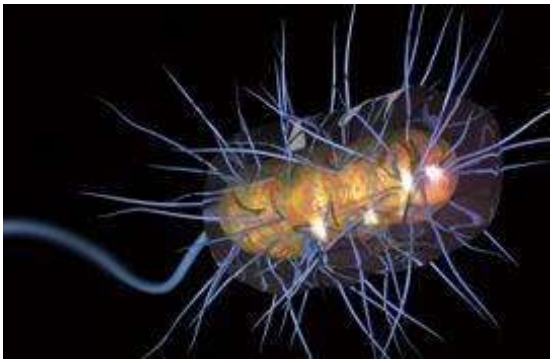
Порядок выполнения работы:

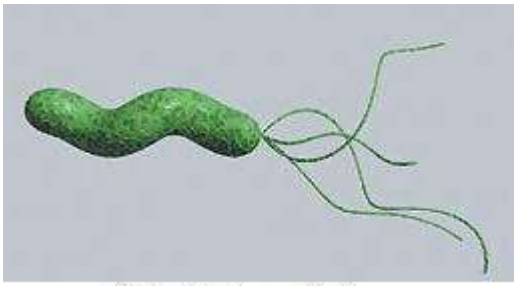
1. Изучить и законспектировать теоретический материал;
2. Приготовить препараты «висячая капля» и «раздавленная капля»;
4. Рассмотреть препараты с помощью иммерсионного объектива;
5. Увиденную картину зарисовать в рабочей тетради;
6. Сделать вывод по проделанной лабораторной работе.

Теоретический материал

Определение подвижности у бактерий помогает идентифицировать микроорганизм. Подвижные виды имеют жгутики (рис. 9, 10) – это тонкие нитевидные образования, они не видны в световой микроскоп, плохо воспринимают красители. Поэтому в лабораториях окраску жгутиков не делают, а исследуют бактерии в живом состоянии.

Спирохеты и лептоспиры подвижны, но жгутиков не имеют, они движутся за счет импульсивных сокращений двигательного фибриллярного аппарата клетки.





Helicobacter pylori -
возбудитель язвы желудка

Рис. 9. Различные типы расположения жгутиков у бактерий

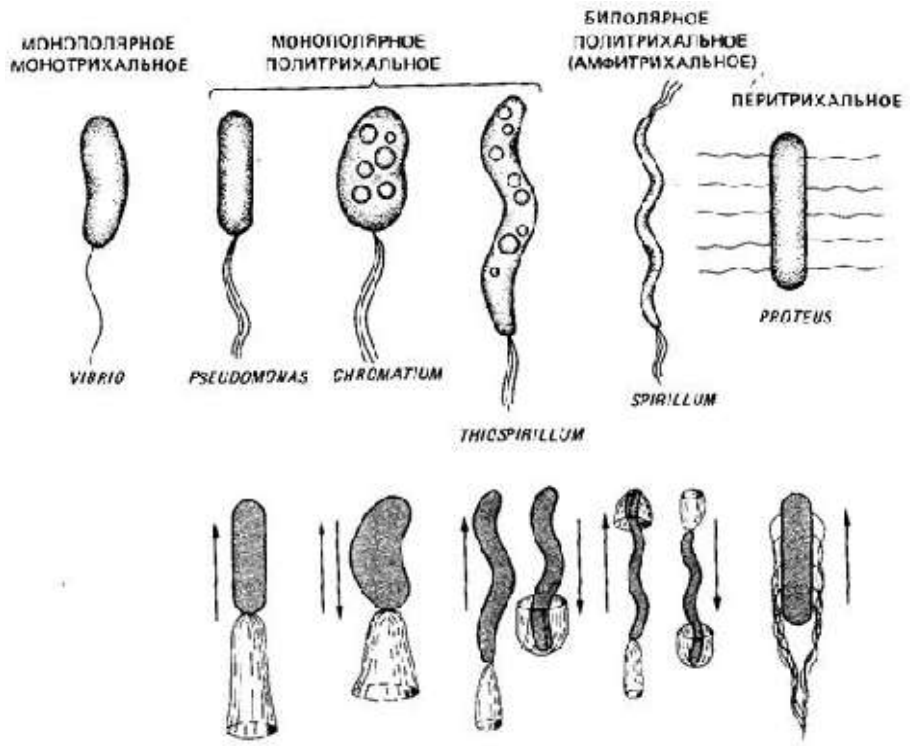


Рис. 10. Основные типы жгутикования и типы движения бактерий

Методы определения подвижности у бактерий:

1. Определение подвижности бактерий методом «висячая капля»

1. Каплю 18-20 часовой бульонной культуры или каплю конденсата агаровой культуры наносят на покровное стекло;

2. Края лунки специального предметного стекла смазывают вазелином;

3. Этим стеклом накрывают покровное стекло с каплей исследуемой культуры;

4. Препарат переворачивают покровный стеклом вверх, и капля висит над лункой;

5. препарат микроскопируют под иммерсией в слегка затемненном поле зрения.

Микрокартина: на сероватом фоне серебристые микробные клетки (подвижные или неподвижные).

2. Определение подвижности бактерий методом «раздавленная капля»

1. На обычное предметное стекло (без лунки) наносят каплю 18-24-часовой микробной культуры;

2. Каплю осторожно накрывают покровным стеклом так, чтобы между стеклами не образовались пузырьки воздуха, а капля культуры не выходила за края покровного стекла;

3. Препарат микроскопируют под иммерсией в слегка затемненном поле зрения.

Микрокартина: на сероватом фоне серебристые микробные клетки (подвижные и неподвижные).

3. Определение подвижности бактерий методом Шукевича

Каплю микробной массы наносят в конденсат скошенной плотной среды (МПА) в пробирке. Подвижные бактерии передвигаясь из конденсата, растут на поверхности среды; неподвижные виды размножаются только в конденсате среды (не «заходя» на поверхность агара). Вместо плотной среды можно использовать полужидкий МПА (мясо-пептонный агар) в пробирке.

Вопросы для самоконтроля:

1. Чем обусловлено движение микроорганизмов?
2. Какие методы определения подвижности у бактерий Вы знаете?
3. В чем заключается метод «висячая капля»?
4. В чем заключается метод «раздавленная капля»?

Лабораторная работа № 6

Тема: Морфология грибов

Цель занятия: Ознакомиться с морфологическими особенностями плесневых грибов и дрожжей.

Материалы и оборудование: Культуры грибов родов Mucor, Penicillium, Aspergillus, Fusarium, взвесь дрожжей, предметные и покровные стекла, препаровальные иглы, бактериологические петли, смесь спирта, глицерина и воды. Таблицы с рисунками морфологии грибов.

Порядок выполнения работы:

1. Изучить и законспектировать теоретический материал;
2. Приготовить препараты из культуры грибов;
3. Рассмотреть под микроскопом культуры грибов;
4. Зарисовать микроскопическую картину.
5. Сделать вывод по проделанной лабораторной работе.

Теоретический материал

Морфология грибов

Грибы, большая группа организмов, выделенных в отдельное царство Fungi. Грибы относятся к эукариотам, т.е. их клетки имеет оформленное ядро. Клетка гриба окружена плотной клеточной стенкой, состоящей из гликана. В клетке имеются все органеллы, присущие животным клеткам, кроме митохондрий (рис. 11, 12).

Вегетативное тело микроскопических грибов (мицелий, грибница) состоит из ветвящихся нитевидных клеток – гифов (рис. 13). Нитевидные грибы условно называют плесневыми. Дрожжи – одноклеточные неветвящиеся грибы.

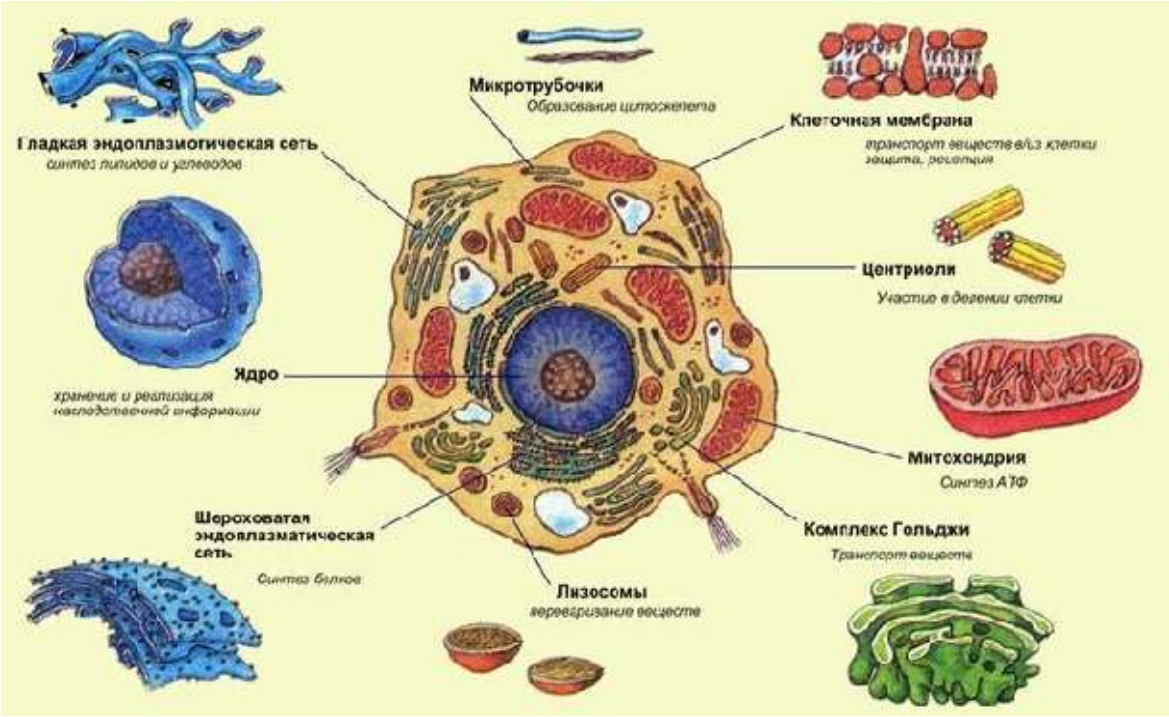


Рис. 11. Строение эукариотической клетки (плоскостное изображение, рисунок)

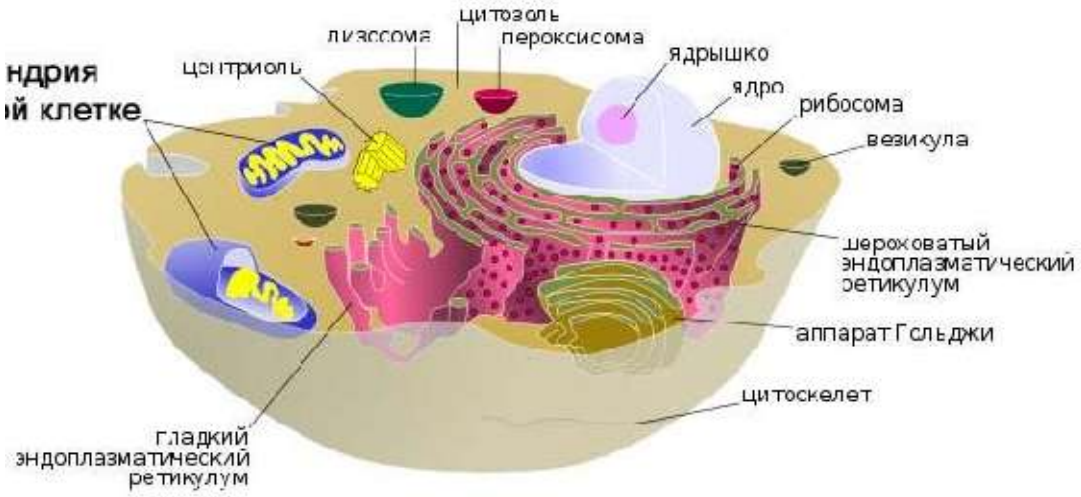


Рис. 12. Строение эукариотической клетки (объемное изображение, рисунок)

Мицелий бывает субстратный (контактирует с питательной средой) и воздушный (возвышающийся над субстратом). Попадая в субстрат, гифы растут концевыми участками и ветвятся радиально от центра, образуя колонию. Молодые гифы бесцветны, и приобретают окраску по мере

старения (черная, бурая, зеленая и др.). По строению мицелий грибы делят на низшие и высшие.

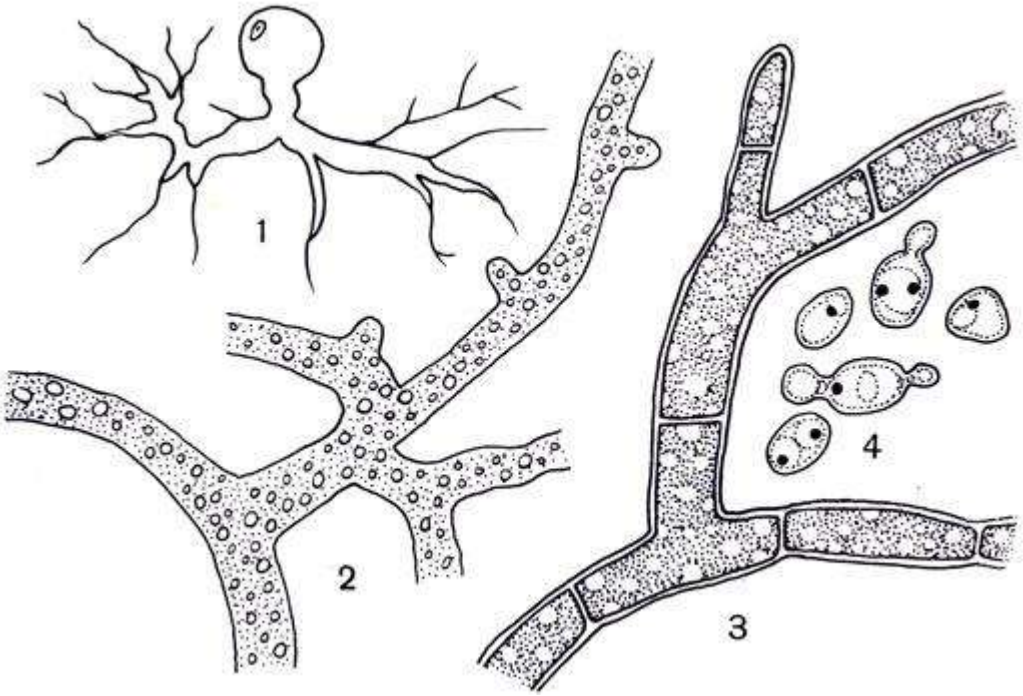


Рис. 13. Типы мицелия у различных грибов:
1 - ризомицелий; 2 – несептированный мицелий; 3 – септированный мицелий; 4 - дрожжи - разновидность мицелия

У *низших грибов* (фикомицеты) мицелий представлен одной сильно разветвленной гигантской клеткой с множеством ядер и без перегородок (несептированный мицелий). *У высших грибов* мицелий септированный. У дрожжей (высшие грибы) мицелия нет, вегетативное тело в виде отдельных клеток, если при почковании клетки не расходятся, образуются их скопления - ложный мицелий. *Видоизменения мицелия*: ризоиды – органы прикрепления и потребления питательных веществ из субстрата; склероции – органы запасания питательных веществ, это сплетения гифов в виде округлых или продолговатых тел.

Размножение грибов

Вегетативное размножение осуществляется участками мицелия или спорами, образующимися при распаде мицелия (способны прорастать в мицелий).

Репродуктивное размножение осуществляется при помощи специализированных органов. Бывает *бесполое размножение* – с помощью специальных клеток (спорангиоспоры, зооспоры, конидии (рис. 14)).

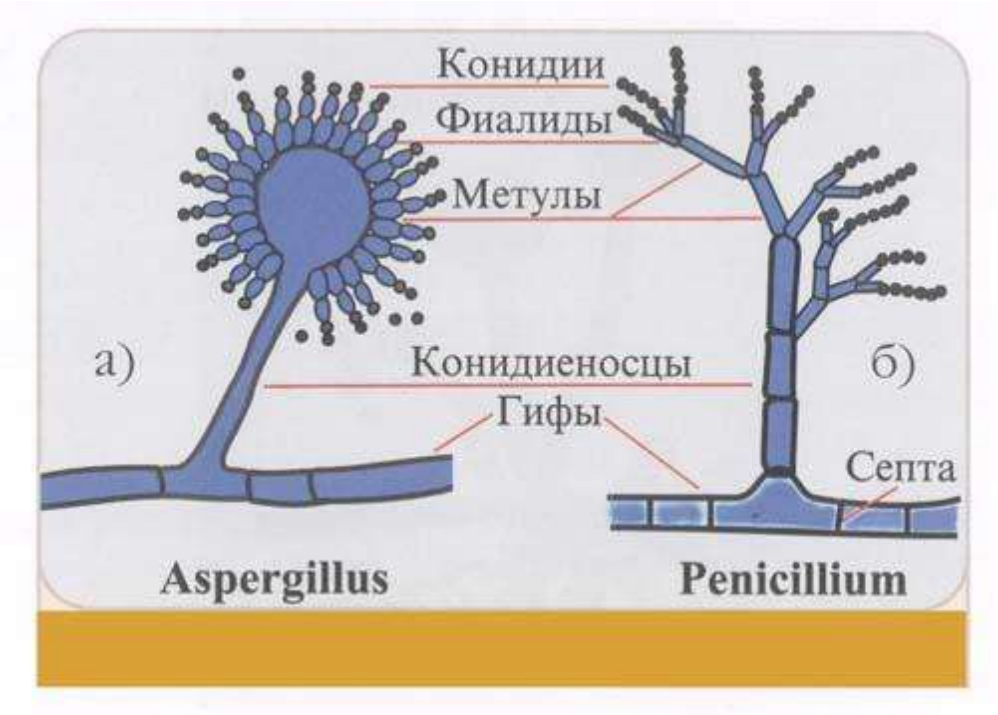


Рис. 14 Схема строение специализированных репродуктивных органов грибов

При *половом размножении* сливаются ядра двух клеток с последующим редукционным делением, в результате образуются специализированные гифы, на которых образуются органы полового спороношения – сумки (аски) у аскомицетов и базидии у базидиомицетов. Внутри аска развиваются аскоспоры, на поверхности базидий – базидиоспоры. Аскомицеты: дрожжи, некоторые плесневые грибы, базидиомицеты (шляпочные, головневые и др.).

У *совершенных грибов* в цикле развития имеются стадии полового и бесполого размножения, у *несовершенных* – только бесполого.

Особенности строения некоторых грибов

Фикомицеты (низшие грибы) представитель - грибы рода Mucor (головчатая плесень). Мицелий несептирован, от него отходят

плодоносящие гифы (спорангиеносцы) со спорангием, внутри которого находятся эндоспорангиеспоры. При созревании спорангиев происходит их разрыв и споры попадают во внешнюю среду. Способны к половому размножению.

Микомицеты (высшие грибы) представители – грибы рода Penicillium, Aspergillus, Fusarium и др.

Penicillium (кистевидная плесень) - мицелий и конидиеносцы септированы. Конидиеносцы ветвятся один или несколько раз в виде кисточки, ветви, на концах которых – конидии (отшнуровываются в виде цепочек).

Aspergillus (леечная плесень) – мицелий септирован, конидиеносцы не септированы. Головкой аспергилуса называют вздутие конидиеносца с ветвлениями и конидиями.

Fusarium – мицелий септирован, розового, фиолотового или др. цвета. На воздушном мицелии формируются конидии (макро- и микро-). Вегетативный мицелий образует хламидоспоры, склероции.

Ascomycetes, представители дрожжи. Размножаются почкованием или делением. Некоторые способны к половому размножению, споры полового размножения (аскоспоры) развиваются в сумках (асках).

Рост грибов на сусло-агаре

Мукор – растет в виде пушистого серого налета. Рост появляется в течение первых двух суток.

Аспергилл – рост на вторые сутки. Колонии могут быть черного, желто-зеленого, желтого, зеленовато-желтого, голубого, сизого цвета.

Пенициллл – образует нежный налет в виде пушка серо-зеленого цвета или ярко-зеленого с белым ободком по переферии. Хорошо выраженные кисточки появляются на 2-3-и сутки.

Фузариум – колонии могут быть рыхлыми, ватообразными, пышными, воздушными или плотными пленчатыми. Колонии белые или различных

тонов розового или желтоватого цвета. Часто и среда окрашивается в цвета от розового до коричневого.

Триходерма – колонии с рыхлой клочковатой или войлочной поверхностью, сначала белого, затем зеленого цвета.

Алтериария – колонии сначала светлые, пушистые, затем зеленовато серые или оливково-черные, бархатистые или ворсистые. Иногда сразу сажисто-черные. Часто темный пигмент окрашивает среду.

Техника микроскопического исследования морфологии плесневых грибов

1. На предметное стекло наносят каплю жидкости, состоящей из равных объемов воды, спирта и глицерина.

2. Бактериологической петлей и препаровальной иглой в эту каплю вносят часть мицелия.

3. Нити мицелия расправляют и покрывают покровным стеклом.

4. Излишки воды удаляют фильтровальной бумагой.

5. Микроскопируют под объективом *40 ид *90 при затемненном поле.

Микроскопия дрожжей

1. Дрожжи предварительно размачивают в воде;

2. Пипеткой наносят смесь на предметное стекло;

3. Окрашивают по Граму (дрожжи грамположительны – окрашиваются фиолетовым);

4. Можно окрашивать и простым способом (фуксином);

5. Микроскопируют по объективом *90.

Вопросы для самоконтроля:

1. Общая характеристика грибов.
2. В чем различие высших и низших грибов, совершенных и несовершенных?

3. Какие способы размножения характерны для плесневых грибов?
4. Какой морфологический признак характерен для дрожжей?

ПРИЛОЖЕНИЕ 1
к лабораторной работе «Морфология грибов»

Морфологическое разнообразие микроскопических грибов

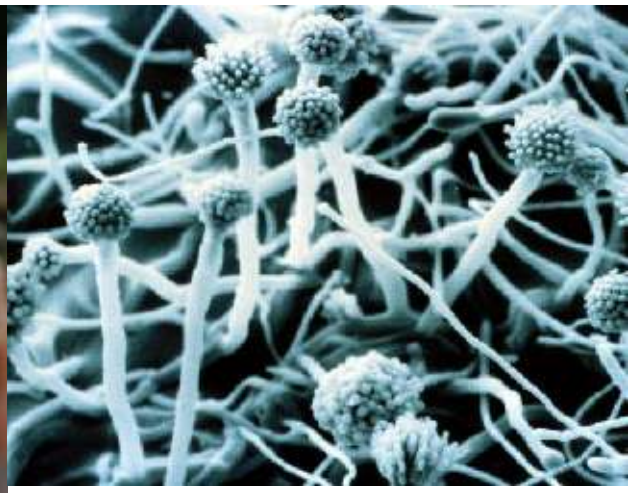


Рис. 15. Морфологическое разнообразие микроскопических грибов

Рис. 16. Морфологическое разнообразие микроскопических грибов

Рис. 17. Морфологическое разнообразие микроскопических грибов

Рис. 18. Морфологическое разнообразие микроскопических грибов

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

к лабораторной работе «Морфология грибов»

Ключ для определения рода грибов

После изучения морфологических и культуральных признаков грибов, определяют их систематическое положение с помощью определителей. Ниже приводиться краткий, адаптированный для учебной практики, «ключ», позволяющий установить родовое название грибов.

1. Грибы размножаются спорангиоспорами, находятся внутри спорангиев,-2.

Грибы размножаются конидиями, образующимися снаружи на конидиеносцах, реже прямо на мицелии, -3

2. Спорангиеносцы, несущие спорангии, обычно простые, реже просто ветвящиеся. Спорангии все одинаковые, -3.

Спорангиеносцы ветвящиеся. Спорангии двух видов: крупные – на главной оси и мелкие (спорангиоли) на боковых ветвях, -4.

3. Спорангиеносцы одиночные, простые, иногда ветвящиеся. Спорангии мелкие или крупные, всегда однородные, бесцветные или окрашенные. Споры круглые или эллипсоидальные, гладкие, бесцветные или сероватые. Мукор (*Mucor*) – рис. 1,а.

Спорангиеносцы расположены кустиками, вырастающими на столонах из одного центра, с большими черными головками. Споры серые, округло-яйцевидные, морщинистые. Ризопус (*Phizopus*) – рис.1,б.

4. Кустовидные ветви расположены мутовчато на главной оси спорангиеносца в один или несколько ярусов. Места ответвлений не раздуты. Споры цилиндрические или эллипсоидальные, бесцветные. Тамнидиум (*Tamnidium*) - рис. 2,а.

Кустовидные ветви отходят от вздутия на главной оси спорангиеносца. Ветви второго порядка так же отходят из вздутых мест. Спорангиоли сидят на вздутиях мелких конечных ветвей. Споры эллипсоидальные или шаровидные, бесцветные. Хетостилум (*Chaetostylum*).

5. Конидии образуются на особых конидиеносцах, отличных от обыкновенных вегетативных гиф, -6.

Конидиеносцы или мало отличаются от обыкновенных гиф, или их нет вовсе, и конидии образуются прямо на мицелии, -14.

6. Конидиеносцы сильно ветвятся различным образом, -7.

Конидиеносцы не ветвятся или иногда ветвятся, но слабо. Ветвление простое, вильчатое или кустообразное, -9.

7. Ветвление древовидное, 8.

Ветвление кистевидное или многократно вильчатое, конидии располагаются цепочками, гладкие, бесцветные или окрашенные, округлые. Пенициллиум (*Penicillium*) – рис. 2,б.

8. Конидиеносцы древовидно разветвлены, большие. Ветви располагаются беспорядочно, конидии на концах ветвей развиваются кустиками, бесцветные, яйцевидные, гладкие. Ботритис (*Botrytis*) – рис. 2,в.

Конидиеносцы древовидно разветвленные. Ветви располагаются мутовчато. Конидии образуются пачками или поодиночке, элепсоидальные или вытянуто-яйцевидные, бесцветные или слабо окрашенные. Вертициллиум (*Verticillium*) – рис. 3,а.

9. Конидиеносцы неветвящиеся, длинные, с кустиками больших грушевидных конидий на конце. Конидии двуклеточные, бесцветные или розоватые. Колонии гриба желтовато-розовые. Трихотециум (*Trichotecium*) – рис. 3,а.

Конидиеносцы и конидии иной формы, -10.

10. Конидиеносцы ветвятся, ветвление простое, реже вильчатое, 11.

Простые, как исключение, просто ветвящиеся конидиеносцы имеют на конце булавовидное или пузыревидное вздутие; иногда такое вздутие отсутствует, -12.

11. конидии крупные, неправильной формы, усеяны бородавочками, расположены цепочками, окрашены в коричневый цвет. Колонии вначале пушистые, потом слизистые, с сильным неприятным запахом мышьяковистого водорода. Акалиум (*Acaulium*) – рис.4,а.

Конидии бесцветные, длинные, серпообразные, многоклеточные (с поперечными перегородками), иногда расположены цепочкой одна за другой

или проявляются прямо на мицелии. Часто окрашены в розовый цвет. Фузариум (Fusarium) – рис.4,б.

12. Концы конидиеносцев булавовидно или пузырчато раздуты и кругом покрыты стеригмами, несущими цепочки конидий, -13.

Расширение на конце часто отсутствует, стеригмы располагаются только на вершине конидиеносцев, но не растут по сторонам. Конидии мелкие, округлые, гладкие, бесцветные, на стеригмах располагаются цепочками. Цитромицес (*Cytromyces*), рис.3,в;

13. Стеригмы, покрывающие булавовидные вздутия, простые, неветвящиеся, несут цепочки конидий. Конидии округлые, гладкие или шиповатые, окрашенные или бесцветные. Аспергиллус (*Aspergillus*) – рис. 4,в.

Стеригмы ветвящиеся, образуют на пузыревидном вздутии конидиеносца два яруса. Верхний несет цепочки конидий. Конидии округлые, гладкие, окрашенные. Стеригматоцистис (*Sterigmatocystis*) – рис. 5,а.

14. Конидии образуются прямо на мицелии, -16.

Конидии образуются на конидиеносцах, мало отличающихся от обыкновенных гиф, -15.

15. Конидиеносцы видны лишь в препарате «висячая капля». Конидии легко рассыпаются, -17.

Места образования конидий видны в обычном микроскопическом препарате, -18.

16. одноклеточные конидии, бесцветные, веретеновидные или округло-удлиненные. Конидии слизистые, черные. Дематиум (*Dematium*) – рис. 5,б.

Конидии одноклеточные, яйцевидные, дрожжеобразные. Молодые колонии похожи на дрожжевые, потом становятся лохматыми. Монилин (*Monilia*) – рис. 5,в.

17. Конидии получаются простым делением мицелия и легко отпадают, бесцветные, прямоугольные, иногда соединены в короткие цепочки. Оидум (*Oidium*) - рис. 6,а.

Конидиеносцы длинные, многоклеточные. Конидии неправильной формы (длинные, округлые или лимонообразные), окрашены в светлый, оливково-зеленый цвет. Кладоспориум (*Cladosporium*) – рис. 6,б.

18. На медленно растущих колониях нет настоящих конидиеносцев. Мелкие, блестящие, желто-коричневые конидии образуются очень длинными цепочками на концах обыкновенных гиф. Катенулария (*Catenularia*). – рис. 6,в.

Крупные, многоклеточные, округло-грушевидной или заостренно-вытянутой формы конидии образуются в одиночку или короткими цепочками на коротких боковых ветвях вегетативных гиф, играющих роль конидиеносцев. Альтернария (*Alternaria*) – рис. 6, г.

Лабораторная работа № 7

Тема: Стерилизация

Цель занятия: Ознакомиться с основными методами стерилизации, их назначением и практическим использованием, а также с приборами для каждого метода. Усвоить правила подготовки к стерилизации лабораторной посуды, инструментов.

Материалы и оборудование: Стерилизаторы, лабораторные инструменты, аппарат Коха, водяная баня, сушильный шкаф, автоклав, бактерицидные ультрафиолетовые лампы, бактериологические фильтры, метиленовый синий, ручной насос, вата, градуированные и пастеровские пипетки, колбы, чашки Петри, пробирки, бумага.

Порядок выполнения работы:

1. Изучить и законспектировать теоретический материал;
2. Приготовить посуду и инструменты для стерилизации:

- нарезать полосками бумагу и завернуть в нее градуированные пипетки,
- сделать ватные пробки к пробиркам, сделать на них бумажные колпачки,
- завернуть пробирки и пастеровские пипетки в бумагу по 10-15 штук;

3. Простерилизовать подготовленные предметы в сушильном шкафу;
4. Сделать вывод по проделанной лабораторной работе.

Теоретический материал

Стерилизация (лат. sterilis - обеспложивание) — процесс, вызывающий гибель микроорганизмов. Стерилизацию проводят физическими и химическими методами, редко – биологическими.

Физические методы

I Методы стерилизации сухим жаром:

1. *Прокаливание* (фломбирование), стерилизуют металлические предметы (бактериологические петли, пинцеты и др.)

2. Стерилизация *сухим нагретым воздухом* производится в сушильных шкафах или печах Пастера (рис. 19) при температуре 160—170°С в течение 1—1,5 ч. Стерилизуют лабораторную посуду, инструменты, минеральные масла, вазелин. Жидкости, воспламеняющиеся вещества, питательные среды, резину сухим жаром стерилизовать нельзя. Предметы, подлежащие стерилизации, заворачивают в бумагу или закладывают в металлические пеналы. Открывать шкаф только после понижения температуры до 45°С.

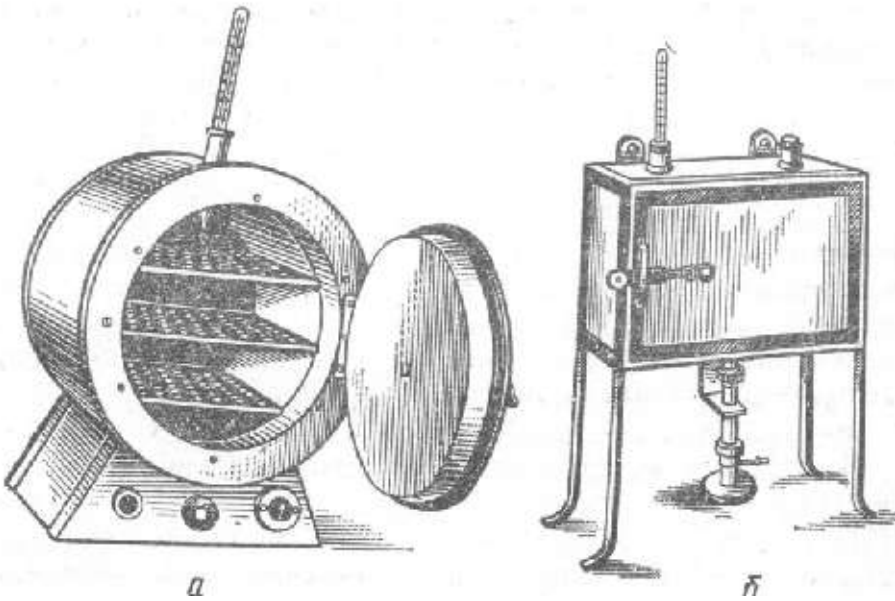


Рис. 19. Сушильные шкафы: а - электрический круглый, б – печь Пастера

II Методы стерилизации влажным жаром.

1. *Кипячение* в течение 30 мин убивает вегетативные формы микробов. Споры многих бактерий при этом сохраняются, выдерживая кипячение в течение нескольких часов. Кипятят в *стерилизаторах* (рис. 21) закрывающаяся металлическая ванночка, с вставной решеткой-подставкой, которую выстилают марлей. В стерилизатор наливают воду, чтобы она покрывала инструменты, закрывают крышкой и кипятят. Затем воду

сливают, инструменты достают после их охлаждения. Обрабатывают шприцы, хирургические инструменты, иглы, резиновые трубки.

2. Стерилизация *текучим паром* проводится в аппарате Коха (рис. 20) при 100°С 30-40 мин. Стерилизуют питательные среды и др. Устройство аппарата: металлический котел с крышкой (есть отверстия для термометра и выхода пара), внутри подставка для инструментов, нагревательные элементы. На дно наливают воду, образующийся пар движется вверх через заложенный материал и стерилизует его.

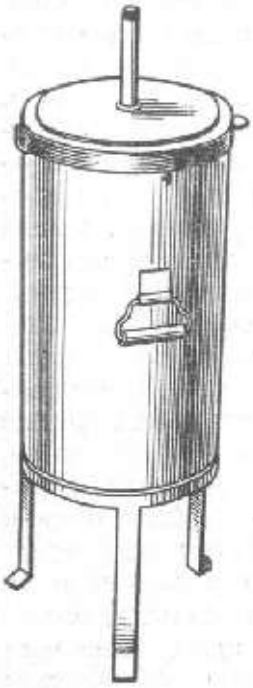


Рис. 20. Текучепаровой аппарат Коха

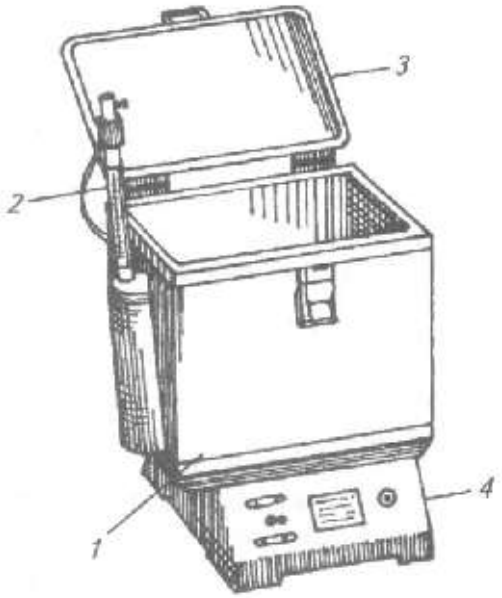


Рис. 21. Электрическая водяная баня: 1-корпус, 2- термометр, 3-крышка, 4- - панель управления

Так как однократное действие паров не убивает споры, применяют дробную стерилизацию — 3 дня подряд по 30 мин. Споры, не погибшие при первом прогревании, прорастают до следующего дня в вегетативные формы и погибают при втором и третьем прогревания.

3. *Тиндализация* – дробная стерилизация ниже 100°С. Стерилизуемое вещество прогревают на водяной бане по 1 ч при 56— 60°С в течение 5—6 дней.

4. *Пастеризация* - однократное прогревание при 70°С в течение 30 мин с последующим быстрым охлаждением и хранением на холоде, чтобы не проросли споры. Применяют для обеззараживания и сохранения молока.

5. *Автоклавирование* - стерилизация насыщенным паром под давлением. Наиболее надежный и быстрый способ. Температура пара под давлением выше, чем температура кипящей воды. Автоклав (рис. 22) - двухстенный металлический котел, покрытый снаружи кожухом и имеющий герметически закрывающуюся крышку. Под рабочим котлом находится бачок с водомерным стеклом и электронагревательными элементами, куда наливают воду. Вода нагревается и образующийся пар по трубке поступает в рабочую камеру котла. Пар вытесняет из рабочей камеры воздух, который выходит наружу через выпускной кран. После того как воздух будет полностью вытеснен из рабочей камеры паром крышку герметически закрывают. Пар доводят до нужного давления (определяют по манометру), и проводят стерилизацию в течение 20 мин.

Автоклавы бывают горизонтальные и вертикальные, отличаются особенность конструкции, но принцип работы одинаков. В автоклаве стерилизуют: питательные среды, растворы, белье, резину, перевязочный материал, инфицированный материал и отработанные культуры микробов.

<u>III Методы холодной стерилизации</u>.

1. Стерилизация *фильтрованием* – пропускание жидкого материала через бактериологические фильтры (рис. 23), производят с разрежением воздуха (созданием вакуума) внутри сосуда-приемника. Фильтруют жидкости, не выдерживающие нагревание (сыворотки крови, растворы антибиотиков и др.). Бактериальные фильтры изготовляют из фарфора, каолина, мелко пористого стекла, асбеста, целлюлозы, нитроклетчатки и других мелкопористых материалов. Имеют значение размер пор и адсорбция микробов на стенках пор фильтров. Фильтры имеют форму свечей (Шамберлана, Беркефельда) или пластинок из асбеста,

нитроцеллюлозы (мембранные фильтры), которые вкладывают в специальные фильтровальные приборы (аппарат Зейтца, прибор Рублевской водопроводной станции). Перед работой их стерилизуют.

2. Стерилизация *ультрафиолетовыми лучами*. С помощью бактерицидных ламп с УФ-излучением обрабатывают воздух в помещениях (боксы, операционные, продуктовые склады).

3. *Ультразвук* – обеззараживают воду, молоко, кожевенное сырье.

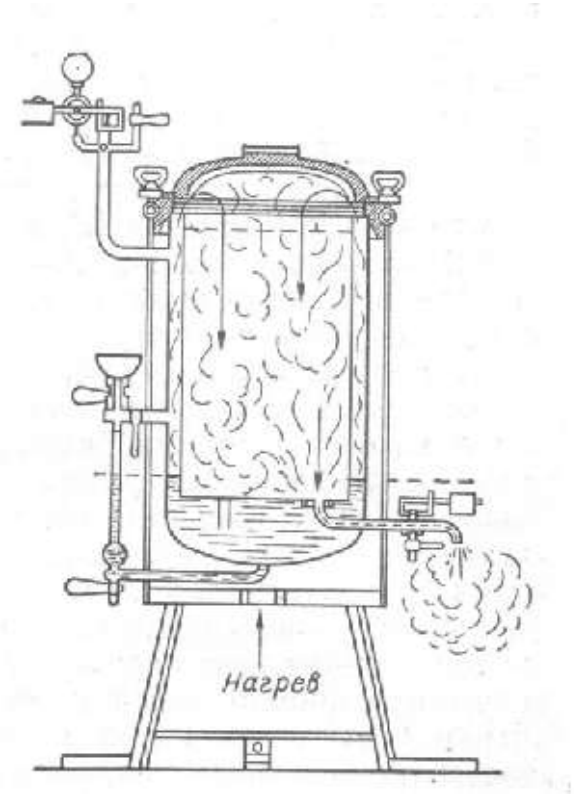


Рис. 22. вертикальный автоклав (схема)

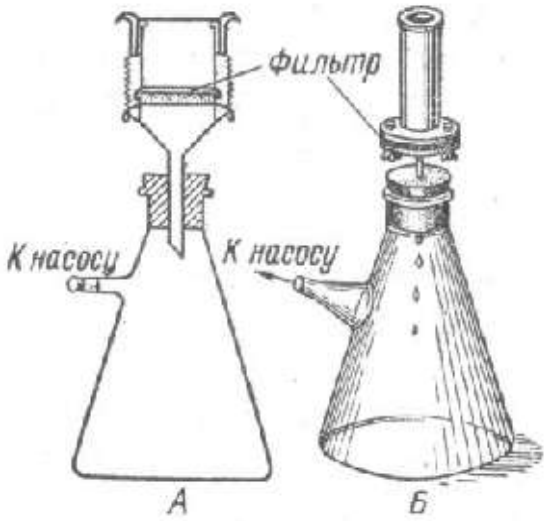


Рис. 23. Фильтры Зейтца: а) со стеклянным и б) с металлическим держателем

Химические методы

Имеют ограниченное применение. Химические вещества применяют для:

А) консервирования питательных сред, вакцин, сывороток;

Б) для дезинфекции. Погибают только патогенные виды.

Биологические методы

Используют крайне редко, например фитонциды, бактериофаги.

Вопросы для самоконтроля:

1. Дайте определение понятия «стерилизация»;
2. Какие методы стерилизации Вы знаете?
3. Что такое автоклав, его устройство и назначение?
4. В чем суть метода стерилизации текучим паром?
5. Что такое дробная стерилизация, в чем ее особенность?
6. В чем суть метода бактериологической фильтрации?

Лабораторная работа № 8

Тема: Питательные среды. Техника приготовления питательных сред

Цель занятия: Ознакомиться с основными питательными средами, их назначением и практическим использованием. Освоить основные методики приготовления искусственных питательных сред.

Материалы и оборудование: Агар-агар, желатин, пептон, NaCl, колбы с мясной водой, раствор 8-10% КОН, воронки, гигроскопическая вата, марля, фильтровальная бумага, градуированные пипетки, дистиллированная вода, стерильные пробирки с ватными пробками, компаратор, электроплитки, готовые сухие среды.

Порядок выполнения работы:

1. Изучить и законспектировать теоретический материал;
2. Приготовить ингредиенты и инвентарь для приготовления питательной среды;
3. Приготовить питательную среду согласно рецепту приготовления;
4. Определить PH приготовленной среды;
4. Разлить питательную среду в пробирки и чашки Петри для застывания;
5. Сделать вывод по проделанной лабораторной работе.

Теоретический материал

Для выращивания микроорганизмов в лабораторных условиях используют питательные среды (ПС), которые обеспечивают потребности микроорганизмов в питательных веществах, воде и т.д.

Дифференциация питательных сред

По составу их делят на: естественные (молоко, сыворотка, яйца, желчь, картофель, горох, морковь и др.) и искусственные (готовят по специальным рецептам).

По происхождению: животного (МПБ, МПА, МПЖ) и растительного (пивное сусло) происхождения, синтетические среды постоянного состава.

По консистенции: плотные, жидкие, полужидкие, сыпучие.

По назначению: *обычные* (простые); *специальные* (элективные) – для выращивания определенного вида микроорганизмов; *дифференциально-диагностические* – для определения родовой или видовой принадлежности микроорганизмов; *селективные* – для выделения микроорганизмов одного рода или вида из многокомпонентного материала.

Требования к питательной среде

1. ПС должна содержать все компоненты, необходимые для пластических и энергетических процессов клетки;
2. ПС должна быть стерильной, обеспложенной;
3. ПС должна иметь определенную РН среды;
4. ПС должна быть аэрируемой.

Приготовление общеупотребительных питательных сред

Мясопептонный бульон (МПБ) – жидкая питательная среда, прозрачная. Исходным материалом служит *мясная вода*. Приготовление мясной воды: свежее (парное) нежирное говяжье мясо (филе) пропускают через мясорубку или нарезают мелкими кусочками, заливают дистиллированной водой 1:2 (на 1 кг мяса 2 л воды); экстрагируют 20-24 ч, затем варят 1,5-2 ч, выкипающее количество жидкости доливают дистиллированной водой до первоначального объема, фильтруют в бутыли или колбы, закрывают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют в автоклаве при 1 атм 30 мин. Стерилизованная мясная вода храниться длительно в сухом, темном прохладном месте.

Приготовление МПБ: К 1 л мясной воды добавляют 1% петпона и 0,5% х.ч. NaCl. Бульон подщелачивают (добавляют небольшое кол-во 10-15% раствора КОН или NaOH), кипятят 2-3 мин и проверяют РН.

Мясо-пептонный агар (МПА) – *плотная питательная среда*. К МПБ добавляют 2-3% промытого мелко нарезанного агар-агара, нагревают до его расплавления, доводят до кипения, в горячем виде проверяют РН (если нужно, устанавливают до нужного уровня), и фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Чтобы агар не уплотнился, фильтруют в аппарате Коха или с помощью специальной металлической двустенной воронкой, между стенками которой заливается горячая вода. Фильтрованный горячий агар разливают по пробиркам и колбам, стерилизуют 20-30мин в автоклаве при 1 атм. После стерилизации пробирки с расплавленным МПА раскладывают в наклонном положении, чтобы конец с пробкой был выше другого, оставляют при комнатной температуре, среда уплотняется, становиться твердой. Получается скошенная поверхность агара, удобная для посева бактерий. Полужидкий МПА готовят также, как МПА, с той лишь разницей, что к МПБ добавляют 0,25% агара, кипятят при помешивании до полного расплавления, устанавливают РН 7,4-7,6, фильтруют в горячем виде, стерилизуют в автоклаве.

Приготовление специальных питательных сред (животного происхождения)

Мясо-пептонная желатина (МПЖ). К МПБ добавляют 10-20% желатины, расплавляют ее и в горячем виде устанавливают реакцию среды, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в стерильные пробирки, стерилизуют текучим паром дробно.

Мясо-пептонный печеночный бульон (МППБ) Кита-Тароцци. Предварительно готовят *печеночную воду*: печень крупно-рогатого скота промывают, очищают и нарезают мелкими кусочками, заливают водой 1:1, кипятят, фильтруют, стерилизуют. Полученную печеночную воду

смешивают с МПБ 2:1 (на 2 л МПБ 1 л печеночной воды). Кипятят, устанавливают РН, разливают по пробиркам (по 8-10 мл). переде разливом среды в пробирки кладут кусочки вареной печени, сверху среду заливают 1-2 мл вазелинового масла, стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм 30 мин.

Кровяной МПА. Асептично полученную дифибринированную кровь лошади (или барана) добавляют к расплавленному и остуженному МПА, осторожно перемешивают вращением колбочки, затем разливают в стерильные чашки Петри. Агар, остывая, уплотняется, чашки ставят в термостат дном вверх для подсыхания. Чтобы получить дифибринированную кровь, берут кровь из яремной вены иглой в стерильный флакон (или колбочку) со стеклянными (фарфоровыми) бусами или шариками, встряхивают осторожно вращательными движениями 15-20 мин, предотвращая свертывание. Фибрин осаждается на бусах.

Приготовление дифференциально-диагностических сред

Среда Эндо. МПА (РН 7,4-7,6) расплавляют на водяной бане, добавляют 0,5-1,0 лактозы, 0,5% насыщенного спиртового раствора основного фуксина, обесцвеченного 10% сернокислым натрием, который добавляют по каплям. МПА с добавленными компонентами кипятят и разливают по чашкам Петри.

Агар Левина (выпускается в сухом виде). Среда состоит из 2%-ного агара Хоттингера с раствором метиленового синего, бактериологическим щелочным эозином, лактозой, двуосновным фосфорнокислым калием (К2НРО4). Порошок среды Левина 5 г растворяют в 100 мл дистиллированной воды, подогревают при помешивании, кипятят 5 мин, разливают по чашкам Петри. После затвердевания среды ее подсушивают в термостате. Среда фиолетового цвета.

Вопросы для самоконтроля:

1. Каково назначение питательных сред?

2. Каким образом дифференцируют питательные среды?

3. Какие требования предъявляют к питательным средам?

4. Каким образом готовиться мясо-пептонный бульон (МПБ) и мясопептонный агар (МПА), в чем различия этих питательных сред?

5. Какие специальные питательные среды животного происхождения Вы знаете?

6. Для чего используют дифференциально-диагностические питательные среды?

Лабораторная работа № 9

Тема: Техника посева и выращивания микроорганизмов

Цель занятия: Освоить технику посевов бактерий на плотные питательные среды.

Материалы и оборудование: Плотные питательные среды, приготовленные на предыдущем занятии, питательные среды с посевами микробных культур, бактериологические петли, чашки Петри, спиртовки, дистиллированная вода.

Порядок выполнения работы:

1. Изучить и законспектировать теоретический материал;
2. Подготовить пробирки и чашки Петри с питательными средами, приготовленными на предыдущем занятии;
3. Подписать пробирки и чашки Петри восковым карандашом (фамилия обучающийсяа, номер группы, число);
4. Сделать посев микроорганизмов на твердую питательную среду различными способами;
5. Чашки Петри и пробирки с питательной средой и засеянными микроорганизмами поместить в термостат на 24 часа при 37-38°С;
6. Сделать вывод по проделанной лабораторной работе.

Теоретический материал

Посевы для культивирования аэробов осуществляют из материала, присылаемого в лабораторию, и из уже имеющихся бактериальных культур. Питательные среды должны быть стерильными. Посевы проводят пастеровской пипеткой или бактериологической петлей. Посев обязательно нужно делать над пламенем горелки. На засеваемых чашках Петри, колбах или пробирках пишут номер экспертизы, под которым зарегистрирован поступивший материал. Все засеянные пробирки ставят в

термостат для культивирования, через 16-18 или 24-48 ч учитывают результат.

Посев в жидкую среду (МПБ, молоко)

Посев делают около пламени горелки. В правую руку берут бактериологическую петлю, прожигают ее над пламенем. В левой руке держат пробирку с исследуемым материалом и пробирку с питательной средой. Края пробок обжигают и вводят стерильную бактериологическую петлю в пробирку с культурой в середину жидкости на жидких средах, затем бактериологическую петлю переносят осторожно в пробирку со стерильной средой. Пробирки закрываю пробками, петлю фламбируют.

Посевы на плотную среду (МПА, МПЖ и др.)

Посев на скошенный агар: пробирки с засеваемой микробной культурой и стерильной питательной средой (МПА) берут в левую руку, держат скошенной поверхностью МПА кверху, пробками в сторону пламени горелки. В открытую у пламени пробирку с микробной культурой осторожно опускают петлю, слегка прикасаясь к поверхности содержимого пробирки, и, взяв одну каплю, переносят ее в пробирку со стерильной средой. Петлю опускают до дна пробирки, погружают в конденсационную жидкость и производят посев штрихом – зигзагообразными движениями петлей проводят вверх по поверхности среды. Пробирки закрывают, петлю прожигают.

Техника посева уколом (на МПЖ): В левой руке пробирка МПЖ (столбиком), пробку вынимают и переворачивают вверх дном или горизонтально. Петлю с бактериальной культурой вводят в толщу среды по центру столбика на всю глубину до дна, после чего вынимают петлю и дезинфицируют ее.

Посев в чашку Петри. Посев делают около горелки, левой рукой фиксируют, большим и указательным пальцем поднимают чашку, так

чтобы образовалось щель. Петлей берут культуру, заносят ее к дальней стенке и легким зигзагообразным движением распределяют на поверхности питательной среды (рис. 24, 25).

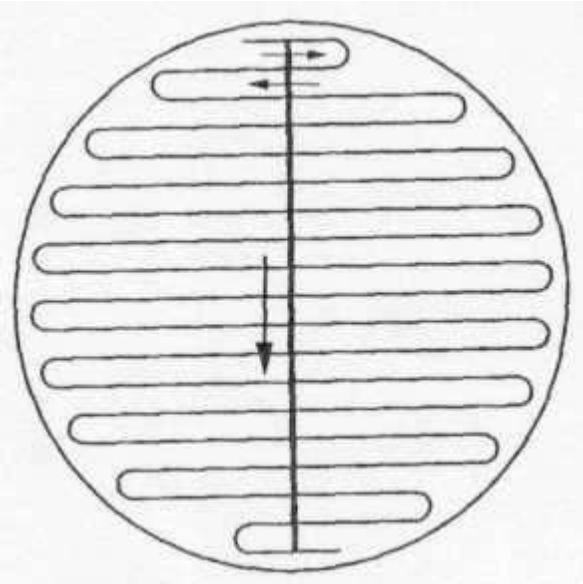


Рис. 24. Схема нанесения бактериальной культуры в чашке Петри

Рис. 25. Колонии микроорганизмов, выросшие на твердой питательной среде в чашках Петри

Вопросы для самоконтроля:

1. С помощью каких инструментов производят посев бактериальной культуры?
2. Какова техника посева бактериальной культуры в МПБ?
3. Какова техника посева бактериальной культуры на МПА, МПЖ?

Лабораторная работа № 10

Тема: Культуральные свойства микроорганизмов

Цель: Ознакомиться с основными культуральными свойствами микроорганизмов – характером их роста в жидких, полужидких и на плотных питательных средах, усвоить, в чем значимость определения культуральных свойств при бактериологической диагностике.

Материалы и оборудование: Пробирки и чашки с посевами прошлого занятия, стерильные питательные среды в пробирках (МПА, МПБ), бактериологические петли, предметные стекла, лупы, микроскопы, таблицы.

Порядок выполнения работы:

1. Изучить и законспектировать теоретический материал;
2. Провести учет результатов посевов на прошлом занятии;
3. Просмотреть культуры макроскопически и микроскопически (объектив*8);
4. Описать культуральные свойства выросших микроорганизмов.

Теоретический материал

Кроме морфологических признаков очень важное значение при определении таксономической принадлежности (семейство, род, вид) имею их культуральные свойства, т.е. характер роста на различных питательных средах.

Рост микроорганизмов в жидких питательных средах (МПБ и др.) проявляется помутнением среды, образованием пленки или осадка.

1. *Помутнение среды*: равномерное (диффузное), интенсивное, умеренное, слабое и в виде опалесценции.

2. *Рост в виде пленки* на всей поверхности среды, подниматься (загибаться) на стенки пробирки или колбы или покрывать только часть

поверхности среды, не доходя до стенки сосуда. Учитывают цвет, оттенок пленки (голубоватый, желтоватый, серый, белый), толщину (тонкая, толстая, нежная, грубая), характер поверхности пленки (складчатая, морщинистая, гладкая, сетчатая, пушистая), консистенцию (хрупкая, слизистая, сальная).

3. *Образование осадка*: обильный и незначительный, плотный (компактный), рыхлый, зернистый, в виде комочков ваты, хлопьевидный, крошковидный, слизистый. По цвету – белый, желтоватый, матовый, зеленоватый, сероватый и др. При встряхивании осадок либо разбивается, создавая равномерное помутнение среды, либо образуются крупные или мелкие хлопья, глыбки; слизистый осадок может подниматься вверх в виде «косички» с помутнением среды, или она при этом остается прозрачной.

4. *Пристеночный рост* сопровождается прикреплением и размножением микробов на стекле (на стенках пробирок) с образованием характерного матового налета, мелких хлопьев, зерен.

Культуры микроорганизмов некоторых видов могут обладать одновременно не одним, а несколькими признаками проявления роста в жидкой среде, например, вызвать помутнение среды с образованием осадка, пристеночного кольца и др.

Рост микробов в полужидкой среде (МППА)

Рост *неподвижных микробов* происходит по уколу в виде беловатого стержня, окружающая среда при этом остается прозрачной.

Подвижные микроорганизмы вызывают помутнение полужидкого агара в виде «облачков».

Рост микробов на плотных питательных средах (МПА)

проявляется образованием *колоний* – скоплений микробов, образующихся в результате размножения одной бактериальной клетки. Колонии могут быть изолированными и слившимися (рис. 26).

<u>На чашках Петри:</u> Изучение их проводят невооруженным глазом и с помощью микроскопа (объектив х 8) или лупы. Под микроскопом чашки Петри помещают на предметный столик дном вверх. Отмечаю следующие характеристики:

1. *характер роста* – обильный, умеренный, скудный, затем однотипность форм колоний (или разнотипность);

2. *форма* – правильная (овальная, круглая), неправильная (звездчатая, корневидная, ветвистая и др.);

3. *размер* (измеряют с помощью линейки или окуляр–микрометра микроскопа) – крупные (диаметр свыше 4 мм), средние (диаметр 2-4 мм), мелкие (диаметр 1-2 мм) и мельчайшие – росинчатые (диаметр менее 1 мм);

4. *край колонии* – ровный (S-форма), шероховатый (R-форма), волнистый, бахромчатый, зубчатый, локонообразный, изрезанный;

5. *прозрачность и блеск* (просматривать в проходящем свете) – прозрачная, непрозрачная, мутная, тусклая, блестящая, флуоресцирующая колония;

6. *цвет* – серовато-белая, бесцветная, белая, кремовая, оранжевая, голубоватая, зеленая, золотистая, желтая, красная, синяя, черная и др. Цвет колоний зависит от цвета вырабатываемого ими пигмента;

7. *профиль* (рельеф) (просматривают в отраженном свете) – выпуклый, плоский, конусовидный, кратерообразный, с валиком по окружности;

8. *поверхность* – гладкая, бугристая, мучнистая, морщинистая, складчатая, бороздчатая, с концентрическими кругами;

9. *консистенция* (определяют прикосновением к поверхности колонии бактериологической петлей) – плотная (легко снимается с агара или врастает в толщу среды), крошковатая, хрупкая, слизистая, тестообразная, маслянистая;

10. *структура* – однородная, волокнистая, пленчатая, зернистая.

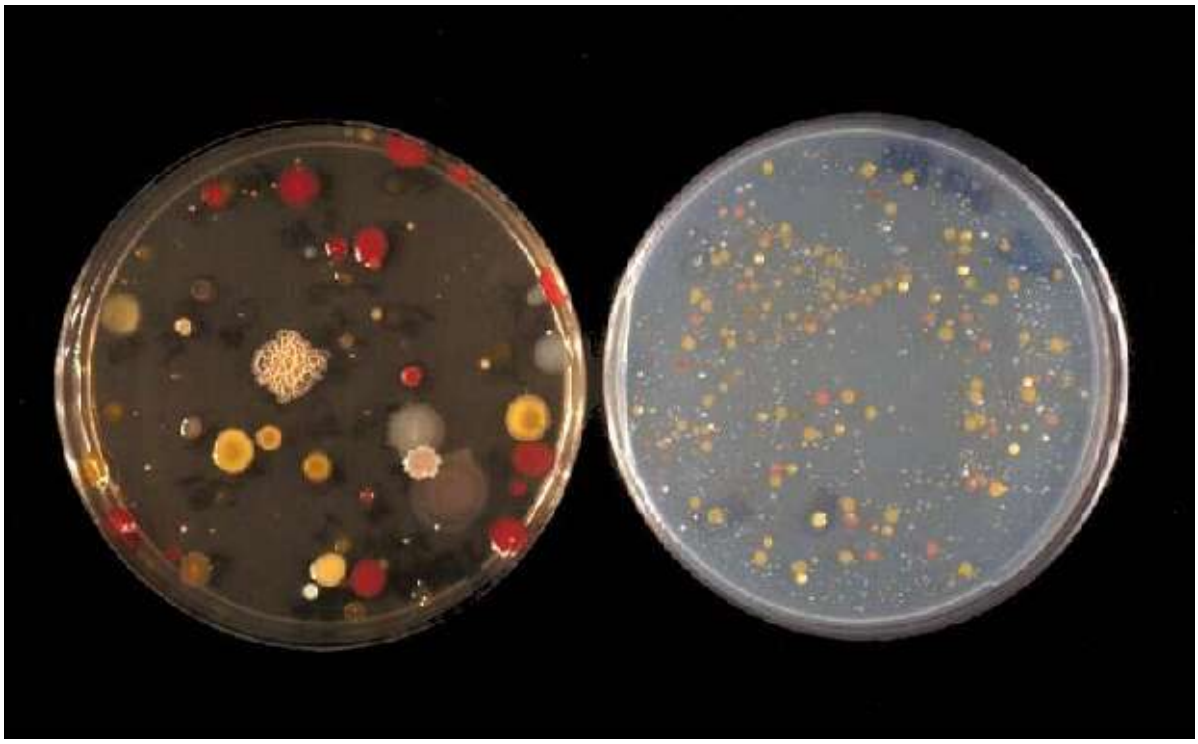


Рис. 26. Различные типы колоний, выросшие на плотных питательных средах

Пробирки с агаровой культурой помещают на предметный столик микроскопа скошенной поверхностью вниз. На поверхности агара *при посеве штрихом* (прикосновение по поверхности зигзагом) бактерии растут в виде изолированных колоний или образуют сплошной налет с ровными, волнистыми, шероховатыми краями. Отмечают цвет, характер поверхности, консистенцию, прозрачность штриха.

При посеве уколом в толщу агара образуются поверхностные, донные и глубинные колонии (обычно округлые, сплющенные, в виде чечевицы). Некоторые микробы образуют колонии с нитевидными выростами в толщу питательной среды (напоминают комочки ваты).

Вопросы для самоконтроля:

1. Что такое культуральные свойства микробов?
2. Что такое колония?
3. В чем особенности роста бактерий в жидких и полужидких средах?
4. Какие характеристики учитывают при изучении колоний?

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

к лабораторной работе «Культуральные свойства микроорганизмов»

Определение качественного состава микроорганизмов по культуральным и морфологическим признакам

Из каждой группы колоний, выросших на плотных средах, готовят препарат и определяют по форме клеток, к какому роду микроорганизмов они относятся. Из общего числа микроорганизмов, развивающихся на МПА, можно выделить следующие роды: *Pseudomonas, Flavobacterium, Bacillus, Micrococcus, Sarcina, Mycobacterium, Actinomyces.*

Род ***Pseudomonas.*** На МПА микроорганизмы рода формируют колонии - круглые, неправильной формы, плоские и выпуклые, слизистые и пастообразные, просвечивающие, бесцветные или пигментированные (грязно-белые, синие, сине-зелёные, красные, жёлтые, бурые и чёрные).

Характерная особенность представителей рода - образование сине-зелёного или жёлто-зелёного флуоресцирующего пигмента. Некоторые колонии удаётся наблюдать только в ультрафиолетовых лучах. У других видов пигменты диффундируют в среду, окрашивая её в соответствующий цвет. Образование определённого пигмента зависит от состава и от реакции среды.

Клетки *Pseudomonas* прямые или изогнутые, часто с заострёнными краями, но не спиральные, они располагаются одиночно, парами или короткими цепочками. Размеры клеток **0,5...1x1,5...4** мкм. Двигаются эти организмы при помощи жгутиков (монотрихи или лофотрихи). Чаще всего это аэробы, но отдельные виды в анаэробных условиях способны использовать для дыхания кислород нитратов. Клетки грамотрицательные.

P. aeruginosa - синегнойная палочка. Представляет собой прямые или изогнутые грамотрицательные, подвижные цепочки длиной 0,5...1,4 мкм и шириной 0,2...0,4 мкм. Образуют ряд пигментов: флюоресцин, пиоцианин и пиорубин. На МПБ вызывает помутнение, образование поверхностной плёнки и серозно-белого осадка. По мере культивирования среда приобретает сине-зелёный цвет, который постепенно при старении и закислении культуры переходит в бурый.

На МПА образует два вида колоний: большие (диаметром 2-5 мм) полупрозрачные сероватого цвета, гладкие с плоскими краями и выпуклым центром («глазунья») и мелкие шероховатые. Вокруг колоний образуется зона, окрашенная в зелёный цвет различных оттенков.

P. fluorescens. Выделяют её из недоброкачественных пищевых продуктов (яйца, мясо, рыба, молоко). Она также восстанавливает нитраты до молекулярного азота. Мелкая подвижная бесспоровая грамотрицательная палочка, размером 1-2 мкм. Культура образует жёлто-зелёный флюоресцирующий пигмент. На МПА колонии часто бесцветные, выпуклые, блестящие.

Род *Flavohacterhim*. На МПа дают колонии диаметром 2-3 мм, чаще гладкие, матовые, прозрачные, жёлтого цвета за счёт каротиноидных пигментов, не диффундирующих в среду, встречаются желтовато-оранжевые колонии, иногда и красные. Клетки палочковидной формы (0.25...0,3х4 мкм), слегка искривлённые, большинство их неподвижны (подвижны только перитрихии). Расположены флавобактерки одиночно, парами и в виде коротких цепочек, иногда в веде нити. Характерен защёлкивающийся тип деления, или снэпинг-тип обособления делящихся клеток. Эндоспор виды рода не образуют. Грамотрицательные.

Род *Micrococcus*. На МПА дают колонии мелких и средних размеров клетки (диаметр 2...4 мм). Колонии могут быть: матовые, блестящие, маслянистые; гладкие, выпуклые, плоские; зернистые, мелко-складчатые, пастообразной или слизистой консистенции, иногда встречаются сухие плотные. Цвет колоний может быть белый, серый, реже они бесцветные, но встречаются буроватые, желтовато-зеленые, розовые и красные. Клетки мелкие (диаметр 0,2...1,5 мкм), одиночные и соединенные в пары, в ряд или бесформенные скопления. Клетки неподвижные, не образуют эндоспор. Грамположительные.

Род *Sarcina*. Колонии средних размеров; круглые, компактные, выпуклые, плоские, гладкие, бугристые, или складчатые, зернистой структуры; матовые или жирно-блестящие. Цвет колоний белый, желтый, лимонно-желтый иногда розовый, красный. Клетки сферические (диаметр 1,8...3 мкм) соединены в пакеты из восьми или более клеток.

Род *Staphyiococcus*. *S. aureus*. Обычно обитает на слизистых оболочках носовой полости, кожных покровах, желудочно-кишечном и генитальном трактах

животных и человека. Оценивается как потенциально патогенный микроорганизм и является возбудителем маститов, бактериемии, пневмоний, абсцессов, пищевых токсикозов. Клетки (0,5...1,0 мкм) в окрашенном препарате расположены одиночно, парами и скоплениями. Некоторые штаммы имеют капсулу. В питательном бульоне растет со стабильным помутнением среды и осадком на дне среды. На плотных питательных средах образует круглые, выпуклые, гладкие, блестящие, непрозрачные колонии. Изолированные колонии на питательных средах достигают 6-7 мм в диаметре. Капсулообразующие штаммы формируют мелкие колонии. Колонии могут быть серого или серо-белого цвета с желтоватым, желто-оранжевым или оранжевым оттенком.

S. epidermidis. Клетки правильной круглой формы, размером 0,5...1,5 мкм, располагаются преимущественно парами и тетрадами. В питательном бульоне растет с помутнением и последующим просветлением среды, формирует слизистый осадок. На агаровой среде колонии округлые, гладкие, выпуклые, блестящие, непрозрачные 3-6 мм в диаметре, Цвет колоний серый или серо-белый. Колонии отдельных штаммов имеют желтый или коричневый оттенок.

S. saprophyticus. Обнаруживают на коже человека и животных и выделяют при патологических процессах мочевого тракта. Клетки в препарате располагаются единично, парами, редко тетрадами. Формирует на плотных питательных средах округлые, выпуклые, непрозрачные, гладкие, блестящие колонии диаметром 5-9 мм. Большинство штаммов не имеют пигмента. Колонии пигментообразующих штаммов желтые или желто-оранжевые.

Род *Mycobacterium*. Относится к группе актиномицетов. На МПА микобактерии растут медленно. Вначале образуют мелкие, круглые компактные колонии, иногда приподнятые, мягкие, пастообразной или слизистой консистенции (растекающиеся по субстрату), бывают сухие крошащиеся; бугристые складчатые; матовые, блестящие, бесцветные или окрашенные (красные, оранжевые, желтые, зеленые, синие, бурые, черные). Пигмент в среду не выделяют. Молодые клетки ветвистые или угловатые с неправильными контурами (3,0...7,0х0,7 мкм). Большинство видов грамположительные.

Род *Bacillus*. Палочковидные бактерии, способные образовывать термоустойчивые споры. Во время формирования споры сохраняется палочковидная форма клетки

или наблюдается небольшое ее утолщение. По характеру роста колоний на МПА (или МПА + сусло-агар) можно иногда определить видовую принадлежность бацилл. Клетки грамположителые. Аэробные.

B. megaterium - капустная бацилла. Колонии гладкие, белые, выпуклые, жирно-блестящие, редко складчатые; края колонии резко очерчены или волокнисто-бахромчатые. На жидкой питательной среде (МПБ) образуется слабая муть. Споры овальные или цилиндрические, не шире материнской клетки, в поперечнике достигают 2 мкм. Длина клеток 5...7 мкм и более.

B. subtilis - сенная палочка. Колонии сухие мелкоморщинистые, бархатистые, бесцветные или розовые, срастающиеся с агар - агаром; край колонии волнистый или слегка волнистый. Палочки короткие тонкие - 3...5 х 0.9мкм. Споры овальные (0,9х0,6 мкм), расположены не строго центрально, но на некоторых средах ближе к центру. Клетки подвижные.

B. mesentericus - картофельная палочка. Колонии на МПА тонкие, сухие, морщинистые, серовато-белые, похожие на брыжейку (отсюда видовое название mesentericus). Палочки тонкие, длинные и короткие, подвижные (3...10х0,5...0,6 мкм), иногда соединены в длинные нити. Споры овальные и продолговатые. При формировании спор клетки теряют палочковидной формы. Прорастание спор экваториально.

B. mycoides - грибовидная палочка. Образует характерные колонии: плоские, ризоидные или мицелевидные, стелющиеся по поверхности агар-агара с отходящими пучками изгибающих нитей. Диаметр клеток 0,8...1,2 мкм, длина в зависимости от среды 5...7, часто 10 мкм и более. Клетки подвижные, Это одна из распространенных аэробных почвенных бактерий.

B. cerius - колонии толстые, компактные, матовые со складчатым центром и ризоидными волнистыми краями; иногда мелкобугристые, с бахромчатыми краями, от который отходят тонкие сплетения нитей. Клетки толстые, диаметром 1...1,5 мкм, длиной 3...5 мкм, иногда более; одиночно расположенные или соединенные в цепочки, нити. Споры овальные, расположены субтерминально, прорастают полярно.

B. idosus - колонии сухие, матовые, плоские, мелкоморщинистые. Целиком снимаются с поверхности агара. Клетки - тонкие прямые палочки (2...3х0,6 мкм),

подвижные. Споры овальные, несколько толще материнских клеток, вследствие чего последние развиваются при спорообразовании. Чаще споры образуются в центральной части клеток.

B. aggiomeratus - колонии на МПА мелкие, белые, плоские, слизистые. Клетки палочковидные (3...6х0,4...0,5 мкм), одиночные или в парах, иногда соединены в короткие цепочки; подвижные (перитрихи). Споры овальные, диаметром 0,5 мкм расположены эксцентрально.

B. virgulus - колонии на агзризованных средах мелкозернистые или волнистые с бахромчатыми краями. Микроорганизм образует длинные нити с частыми перегородками, распадающиеся на отдельные клетки разной длины (4...10х0,7...0,8 мкм). Споры овальные, в поперечнике более диаметра клетки, поэтому при формировании клетки раздуваются, принимают веретенообразную или булавовидную форму. Условный анаэроб.

B. brevis - колонии белые, иногда с желтоватым оттенком, гладкие, выпуклые или плоские блестящие с зубчатым краем, лучше развиваются на синтетических средах. Клетки (3...5х0,7...1,0 мкм) подвижные (перитрихи), реже соединены в цепочки. Споры овальные, диаметром 0,3...1 мкм, расположены на конце клеток, раздувая их оболочки. Бывают грамположительными и грамотрицательными.

B. polymyxa - колонии бесцветные плоские или вогнутые, гладкие или слизистые, иногда края имеют пальчатые выросты. Рост колоний на средах умеренный или хороший. Клетки (2,0...7,0х1,0...1,7 мкм) одиночные, парные или в коротких цепочках; подвижные. Споры овальные, продолговатые (2,6х1,7 мкм), расположены центрально. При спорообразовании клетки раздуваются клостридиально или лимоновидно. Факультативный аэроб.

B. asterosporus - колонии мелкие белые или сероватые с зеленоватым отливом плоские, нежные, слизистые, гомогенные. Клетки - толстые палочки (3...7х1,0...1,2 мкм), расположены одиночно или в парах, подвижные. Споры цилиндрические или продолговатые (1,5...2,0х1,0 мкм), расположены в центральной части клеток, последние при спорообразовании принимают клостридиальную форму.

B. simplex - колонии гладкие, жирно-блестящие, иногда слизистые; выпуклые, рост хороший. В старых культурах отдельные штаммы приобретают желтовато-бурую окраску. Клетки мелкие (2,5х0,6 мкм), обычно одиночные, цепочки не

образуют. Споры овальные (0,9х0,6 мкм), расположены субтерминально; встречаются в почве.

Род *Protaus*. *P. vu'garis* - колонии на МПА имеют вид нежного стелющегося налета. Клетки мелкие (1,6...4 мкм), бесспоровые, подвижные палочки, позднее появляются нитевидные формы длиной (10...20 мкм), грамотрицательные. Факультативный - анаэроб.

Род *Escherichia*. *E. coli* - кишечная палочка. На МПА образует гладкие, выпуклые, блестящие с ровными краями колонии. На МПБ растет диффузно, образуя интенсивную равномерную муть и легко разбивающийся осадок; иногда образует поверхностную пленку и кольцо на стенке пробирки. На агаре Эндо ферментирующие лактозу штаммы образуют темно-вишневые с металлическим блеском колонии; слабо или медленно ферментирующие лактозу штаммы образуют розовые или бесцветные колонии с интенсивно окрашенным центром; штаммы, не ферментирующие лактозу, формируют бесцветные колонии. Клетки - короткие, подвижные бесспоровые палочки с закругленными концами, грамотрицательные. Размером (2.,.4хО,5 мкм), располагаются одиночно, парами или короткими цепочками.

Род *Actinomyces* - лучистые грибы. Образуют плотные кожистые колонии различной структуры (гладкие, бугристые, складчатые, бородавчатые с мучнистым налетом), белого, серо-белого, кремовато-белого оттенков; срастаются с субстратом и состоят из несептированных ветвящихся нитей.

Лабораторная работа № 11

Тема: Микробиологическое исследование воздуха, воды: постановка

Цель работы: Ознакомиться с правилами взятия и пересылки проб воды для исследования. Определить общее количество живых микробов в 1 мл водопроводной (питьевой) воды путем посева в чашки Петри с МПА, используя метод разведения. Исследовать воздух седиментационным методом (метод Коха), и ознакомиться с аспирационным методом (с помощью прибора Кротова).

Материалы и оборудование: Стерильные чашки Петри, МПА в пробирках, водяная баня, спиртовка, тушь, электроплитка, термостат, микроскоп, таблицы, схемы.

Порядок выполнения работы:

1. Изучить и законспектировать теоретический материал;
2. Подготовить пробирки и чашки Петри с питательными средами;
3. Подписать пробирки и чашки Петри восковым карандашом (фамилия обучающийсяа, номер группы, число);
4. Сделать посев воздуха методом Коха на твердую питательную среду;
5. Сделать посев водопроводной воды на твердую питательную среду;
6. Чашки Петри и пробирки с питательной средой и засеянными микроорганизмами поместить в термостат на 24 часа при 37-38°С;
7. Сделать вывод по проделанной лабораторной работе.

Теоретический материал

Микробиологическое исследование воздуха

В воздухе закрытых помещений находятся как сапрофитные микроорганизмы, так и патогенные бактерии и вирусы; менингококки, патогенные стафилококки, возбудители дифтерии, туберкулеза, коклюша, вирусы гриппа, оспы, аденовирусы и др. Санитарно-бактериологические

исследования воздуха проводят в плановом порядке в больницах. Также по показаниям в общественных местах: детских садах, школах, аптеках, столовых, кинотеатрах. Исследуют также атмосферный воздух.

Воздух исследуют следующими методами: седиментационным, аспирационным и фильтрационным.

1. Седиментационный метод — оседание микробов по Коху. Используют только при исследовании воздуха закрытых помещений. Для этого чашки Петри с питательными средами оставляют открытыми в местах отбора проб в течение 5—10 мин. После чашки зарывают и помещаю в термостат при 37°С на 24 ч, а затем при комнатной температуре выдерживает еще сутки. О степени загрязненности воздуха судят по количеству выросших колоний (проводят на следующем занятии). Несмотря на неточность, данный метод пригоден для сравнительных оценок чистоты воздуха.

2. Аспирационные методы используют при исследовании воздуха как закрытых помещений, так и атмосферного. Наиболее широкое применение в последние годы получил аппарат Кротова (рис. 27), который позволяет пропускать от 25 до 50 л воздуха в минуту.

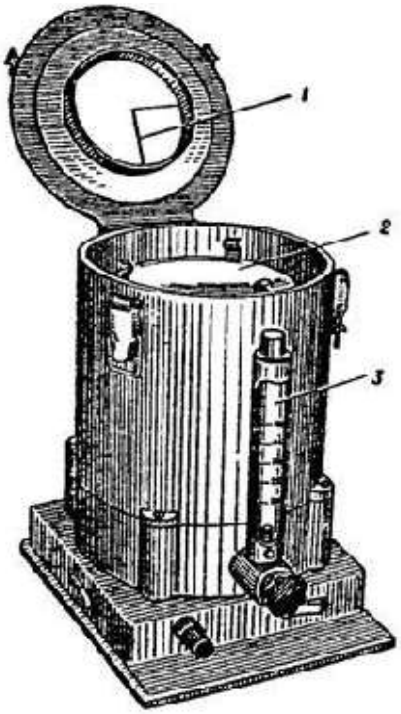


Рис. 27. Прибор Кротова (1 – клиновидная щель; 2 – вращательный диск; 3 - реометр)

В аппарате Кротова воздух засасывается сквозь узкую щель крышки прибора и ударяется о поверхность плотной питательной среды в чашке Петри, которая медленно вращается на подвижном столике. Поверхность питательной среды равномерно обсеменяется микроорганизмами. Для установления общей бактериальной обсемененности воздуха закрытых помещений, согласно инструкции, отбирают две пробы воздуха с помощью аппарата Кротова по 100 л каждая.

3. Фильтрационный метод. Определенный объем воздуха пропускают через стерильную питательную среду (МПБ), физ.раствор и стеклянные бусы, сыпучие вещества (порошок, сахара). Далее смесь с микробами вносят на питательную среду в чашки Петри, и ставят в термостат на 24 часа.

Микробиологическое исследование воды

Санитарно-бактериологическому исследованию подлежит питьевая вода централизованного водоснабжения, колодцев и родников, открытых водоемов (реки, озера, пруды), плавательных бассейнов, минеральная вода и сточные воды.

Цели микробиологического исследования воды:

1. Выявление общей микробной загрязненности;
2. Обнаружение в воде патогенных микробов;
3. Установление наличия кишечной палочки (определение коли-титра).

Правила взятия пробы воды для бактериологического исследования:

1. Из водоемов, в которых имеется источник загрязнения берут 3 пробы воды: выше, напротив и ниже источника загрязнения.

2. Пробы воды из колодцев берут 2 раза: утром до начала разбора воды и вечером после разбора воды.

3. Из рек, озер и прудов воду берут на глубине 0,5-1,0 м от поверхности и на расстоянии 1-2 м от берега.

4. Пробы воды отбирают в сухие стерильные колбы, бутыли с притертыми крышками.

5. При взятии проб воды из глубины используют специальные приборы – батометры (на тросе опускают на глубину, там прибор открывается и в него набирается вода, после поднимают на поверхность).

6. При отборе проб воды из крана воду сначала сливают (10-15 мин), а затем кран обжигают пламенем спиртовки.

7. Все взятые пробы воды нумеруются. В сопроводительном документе указывается: наименование водоема, место расположения, дата взятия пробы, цели исследования.

8. Пробы воды доставляются в лабораторию немедленно. Исследование проводят не позднее 2-х часов. Допускается проводить анализ через 6 часов, при условии хранения воды при температуре 1-5°С.

9. Пробы питьевой воды для бактериологического исследования берут в количестве 400—500 мл, при исследовании сточных вод— 100 мл, а для определения патогенных энтеробактерий (сальмонеллы, шигеллы) и кишечных вирусов— 1л.

Исследование водопроводной воды

В качества питательной среды используют МПА. Воду пред исследованием необходимо развести.

Разведение воды: В течение 10-15 мин воду спускают из водопроводной трубы. После чего пламенем горелки (спиртовки) обжигают кран. Воду набирают в стерильную колбу. Готовят ряд пробирок с 9 мл стерильной воды. Пробирки нумеруют. Стерильной пипеткой берут 1 мл исследуемой воды и вносят в пробирку №1 с 9 мл стерильной воды, обжигая при этом пробку и горло пробирки над пламенем спиртовки (разведение 1:10). После перемешивания воды стерильной пипеткой берут 1 мл из пробирки

№1 и вносят в пробирку №2 (разведение 1:100). После перемешивания воды в пробирке №2 новой стерильной пипеткой берут из нее 1 мл и вносят в пробирку №3 (разведение 1:1000).

После разведение воды из каждой из 3-х пробирок делают посев. Начинают из пробирки последнего разведения.

Посев делают следующим образом: На поверхность стерильной питательной среды в чашке Петри наливают 0,2 мл воды из пробирки №3.разравнивают воду по поверхности стерильным стеклянным шпателем. Чашку закрывают и подписывают. Необходимо подождать, пока вода впитается в питательную среду. После чего чашку помещают в термостат при температуре 22-25°С, дном вверх. Процедуру повторяют с водой всех разведений (пробирки №1 и №2).

Через 3-5 суток проводят учет результатов посевов.

Определение количества бактерий группы кишечной палочки (коли-титр и коли-индекс)

Коли-титром называется минимальное количество (мл) воды, в котором содержится хотя бы одна кишечная палочка. Коли-индексом называется количество кишечных палочек, содержащихся в 1 л воды.

Бактерий группы кишечной палочки называют колиформные бактерии, представитель *Escherichia coli*. Это палочковидные грамотрицательные бактерии, спор не образуют. Обнаружение в воде кишечной палочки рассматривается как показатель фекального загрязнения воды, а их количество позволяет судить о степени этого загрязнения.

Количество бактерий группы кишечной палочки определяют методом мембранных фильтров и бродильным методом.

Для перевода коли-индекса в коли-титр 1000 делят на число, выражающее коли-индекс. Для перевода коли-титра в коли-индекс необходимо 1000 разделить на число, показывающее коли-титр.

Вопросы для самоконтроля:

1. Для чего необходимо проводить микробиологическое исследование воздуха?
2. Какие способы микробиологического исследования воздуха вы знаете?
3. Каков механизм работы аппарата Кротова?
4. Какая вода подлежит микробиологическому контролю?
5. Какие правила взятия пробы воды для бактериологического исследования Вы знаете?
6. Как проводят разведение воды?
7. Каким образом делают посев для микробиологического исследования воды?
8. Что такое коли-индекс и коли-титр?
9. О чем говорит обнаружение в воде бактерий Группы кишечной палочки?

Лабораторная работа № 12

Тема: Микробиологическое исследование воздуха, воды: учет

Цель работы: Ознакомиться с методикой оценки микрофлоры воздуха и воды. Определить общее количество живых бактерий в 1 мл водопроводной воды и в 10 л воздуха.

Материалы и оборудование: Посевы микроорганизмов в чашках Петри из воздуха и воды, сделанные на предыдущем занятии, лупы, микроскопы, таблицы, схемы.

Порядок выполнения работы:

2. Изучить и законспектировать теоретический материал;

2. Провести учет результатов посевов на прошлом занятии;

3. Рассмотреть культуры макроскопически и микроскопически (объектив*8);

4. Описать культуральные свойства выросших микроорганизмов;

5. Провести количественный учет микрофлоры воздуха и воды;

6. Ответить на вопросы для самоконтроля.

Теоретический материал

Учет результатов микробиологического исследования воздуха

Количественные учет микрофлоры воздуха. Колонии бактерий подсчитывают через 24 часа инкубации в термостате. Подсчет проводят, не открывая чашек Петри. Для удобства карандашом по стеклу отмечают просчитанную колонию точкой на наружной стороне чашки. Подсчет колоний проводят по всей поверхности чашки. Считают, что из каждой живой клетки вырастает колония. Рассчитать количество микробов в 1 м³ воздуха по формуле:

$$X = \frac{A * 10_0 * 5}{Б * 1_0 * В} 1000,$$

где, **X** – количество микробов в 1 м³ воздуха; **А** – количество колоний на МПА в чашке Петри; **Б** – площадь чашки ($S=2\pi r^2$, где $\pi=3,14$; r – радиус, радиус это расстояние от центра до края окружности, измеряется в см; **В** – время, в течение которого взята проба воздуха; 100; 5; 10 – показатели того, что на площади 100 см² за 5 мин оседают микроорганизмы из 10 л воздуха. Результаты можно отразить в таблице 2:

Табл 2. Количественный учет микрофлоры воздуха в ПГСХА

Исследованное помещение	Время экспозиции, мин	Число колоний в 1 м³ воздуха	Число бактерий в 1 м³ воздуха
Учебная лаборатория			
Коридор учебного корпуса			
Буфет			
Гардероб			
И другие помещения			

Качественный учет микрофлоры воздуха.

Колонии нужно дифференцировать по их внешним особенностям. Описать их *культуральные свойства*: характер роста, форма, размер, край колонии, прозрачность и блеск, цвет, профиль, поверхность, консистенция, структура (лабораторная работа №9).

Для определения *морфологии бактерий* необходимо следующее: из понравившейся колонии сделать мазок на предметном стекле, зафиксировать его и окрасить (по Граму, простым способом и др). Описывают морфологические признаки микробов: форма и размеры клеток, характер расположения клеток, подвижность, наличие или отсутствие спор, капсул, и т.д. Подвижность определяют методом раздавленной капли. Для этого бактериологической петлей берут часть колонии, переносят на предметное стекло и размешивают с каплей физ.раствора, накрывают покровным стеклом и смотрят в микроскопе (*90) с помощью иммерсионной системы в затемненном поле.

Для определения *рода и вида бактерий* необходимо выделить чистую культуру: отсеять колонию в стерильную среду на скошенный агар, инкубировать в термостате 24 часа. После этого исследуют биохимические свойства микробов, и пользуясь специальным определителем (книга, таблица) определяют таксономическую принадлежность микробов.

Учет результатов микробиологического исследования воды

Количественные учет микрофлоры воды. Техника учета колоний та же, что и при исследовании воздуха. Колонии учитывают в каждой чашке Петри, соответствующих различным разведениям воды. Количество микробов в 1 мл воды рассчитывается по формуле:

M= ,

где, M – количество клеток в 1 мл; A – число колоний; 10 – коэффициент разведения, n – порядковый номер разведения, из которого сделан высев; V – объем суспензии, взятый для высева, в мл.

Если посев воды делался без предварительных разведений, то формула имеет следующий вид:

..

M =

где, A – число колоний; V – объем суспензии, взятый для высева, в мл.

Оцениваются только те разведения, при которых в чашке Петри выросло от 30 до 300 колоний. Результат выражается числом КОЕ (колонеобразующих единиц) в 1 мл воды.

Если посев производился без предварительных разведений, а объем внесенной для посева воды равен 1 мл, то КОЕ равно количеству выросших колоний.

Согласно СанПин 2.1.4.1074-01. Общее число микроорганизмов не должно превышать 50 КОЕ в 1 мл.

Качественный учет микрофлоры воды проводиться по тому же алгоритму, что и при исследовании воздуха.

Вопросы для самоконтроля:

1. Как проводят количественный учет микрофлоры воздуха и воды?
2. По какой формуле рассчитывается количество микробов в 10 л воздуха?
3. По какой формуле рассчитывается количество микробов в 1 мл воды?
4. Как проводят качественный учет микрофлоры воздуха и воды?

Лабораторная работа № 13

Тема: Микробиологическое исследование почвы

Цель работы: Ознакомиться с методами санитарно-биологического исследования почвы. Определить микробное число почвы методом посева на МПА.

Материалы и оборудование: весы, разновесы, часовое стекло, скальпель, ступка, резиновая перчатка, колба со стерильной дистиллированной водой, пипетки на 10 мл и 1 мл, микропипетки на 0,1 мл, пробирки, колба объемом 250 мл, колба с питательной средой, чашки Петри, стеклянный шпатели, термостат, микроскоп, таблицы, схемы.

Порядок выполнения работы:

1. Изучить и законспектировать теоретический материал;
2. Приготовить разведения почвы;
3. Сделать посев почвенных микроорганизмов на МПА;
4. Произвести учет результатов;
5. Ответить на вопросы для самоконтроля.

Теоретический материал

Санитарно-бактериологическое исследование почвы

Почва является главным резервуаром и естественной средой обитания микроорганизмов в природе. Микроорганизмы почвы принимают активное участие в формировании и самоочищении ее, а так же в круговороте азота, углерода, серы, фосфора, железа и других соединений. Качественный состав микрофлоры почвы очень разнообразен. В его состав входит множество бактерий (преимущественно спорообразующих); актиномицетов, спирохет, простейших, цианобактерий, микоплазм, грибов и вирусов.

Почва принимает на себя максимальное количество загрязнений, например, в результате фекального загрязнения почва обогащается

представителями микрофлоры кишечника: *E. coli, Enterococcus, Cl.perfringens* и др. С фекалиями больных животных в почву попадают возбудители столбняка, клостридиозов, эмкара и других заболеваний. Они образуют в ней споры и длительное время живут там. В связи с этим, почву рассматривают как среду, через которую может осуществляться передача возбудителей многих инфекций.

Санитарно-бактериологическое исследование почвы необходимо при планировании и выборе места при строительстве населенных пунктов, животноводческих помещений, овощехранилищ и водохранилищ. В случае определенной эпизоотической ситуации почва также может служить основанием для проведения бактериологических исследований. Исследование почвы может быть проведено в виде **краткого** или **полного** анализа.

Краткий анализ почвы включает:

1. Определение титра санитарно – показательных микроорганизмов (БГКП);
2. Определение микробного числа.

Полный анализ включает определение:

1. Санитарно-показательных микроорганизмов (БГКП);
2. Микробного числа;
3. Количество анаэробов (*Cl. perfringens*);
4. Термофильных микроорганизмов, определяющих характер загрязнения (компосты, навоз, фекалии).

Правила отбора проб почвы

На исследуемой территории до 1000 м^2 выделяют два участка по 25 м^2 каждый: 1–й – вблизи источника загрязнения, 2–й – вдали от него (контроль). Образцы почвы забирают в 5 точках – по тиру конверта:

4 – по углам участка и 1 – в центре. Взятые пробы, массой 200-300 грамм перемешивают и затем берут средний образец.

Образцы почвы берут с глубины 20 см от поверхности или же 0,75-2 м, предварительно сняв стерильной лопатой верхний слой почвы, который может быть загрязнен посторонней микрофлорой. Из глубоких слоев (до 3-х метров) пробы почвы забирают специальным буром.

Взятые пробы помещают в стерильную банку с ватно-марлевой пробкой, покрывают пергаментной бумагой. К банке приклеивают этикетку с датой, № образца и доставляют в лабораторию.

Обработку пробы желательно проводить в день исследования, хранение допускается в течение 24 часов при температуре 4-5^{0}С.

Подготовка почвы для анализа

Образцы почвы освобождают от крупных включений (щебня, корней, листьев), размельчают, просеивают через стерильное 3-х мм сито и тщательно перемешивают. Из средней пробы отвешивают 1 г почвы и переносят в колбу с 99 мл стерильной воды (получают разведение 1:100). Колбу встряхивают в течение 10 мин. Из полученной почвенной суспензии приготавливают до 4-6 *последовательных разведений* (рис. 28)

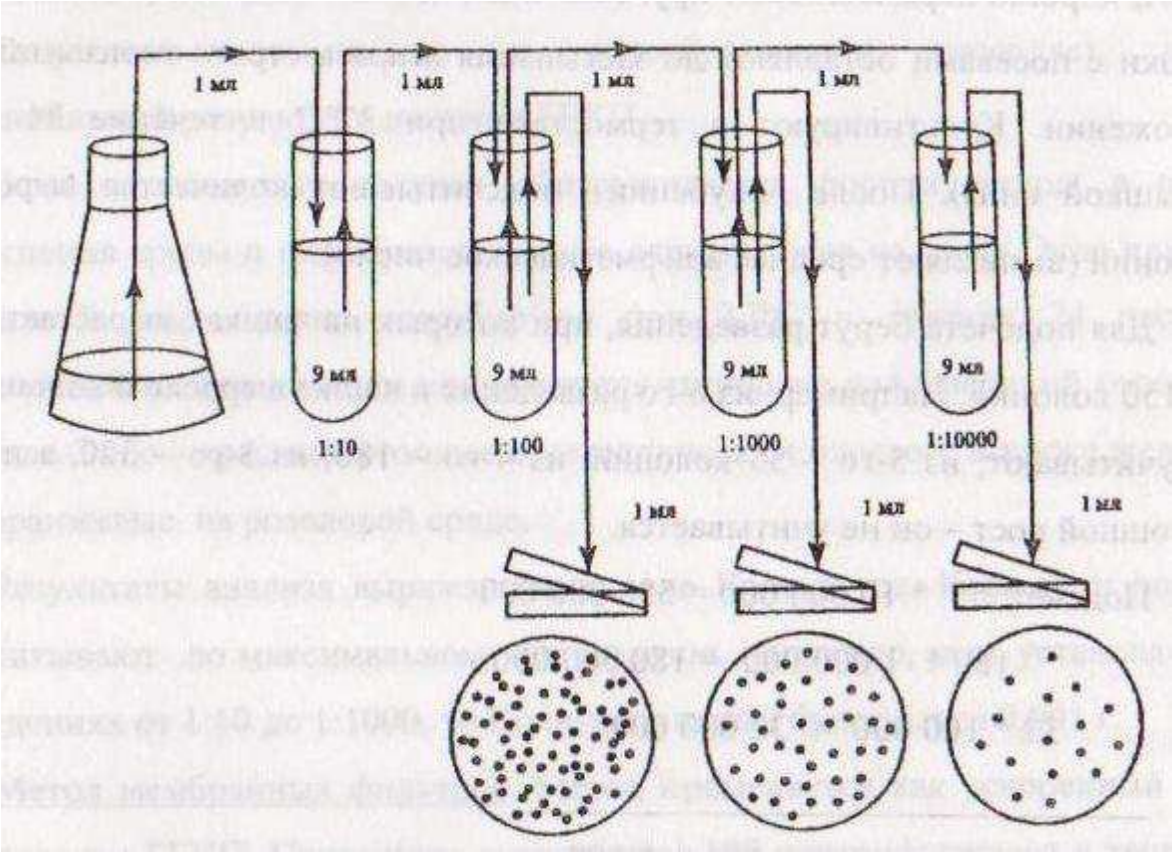


Рис. 28. Методика приготовления разведений и высева почвенной суспензии на МПА

Для этого берут штатив с пробирками, содержащими по 9 мл стерильной воды в каждой. Из первоначальной взвеси (1:100) 1 мл стерильной пипеткой переносят в первую пробирку и получают разведение 1:1000, из этой пробирки переносят 1 мл в следующую – получают разведение 1:10000 и так до нужной степени разведения.

Определение микробного числа почвы

Микробным числом почвы называют количество микроорганизмов, находящихся в 1 г почвы. Для определения микробного числа почвы используют 2 метода: посев на плотные питательные среды и метод прямой микроскопии.

Определение микробного числа почвы методом посева.

Из каждого разведения почвы берут 1 мл суспензии и переносят в стерильную чашку Петри (не менее 2-х чашек на каждое разведение).

Затем в чашку наливают по 10-15 мл расплавленного и охлажденного до 45 ^{0}С МПА, хорошо перемешивают круговыми движениями на поверхности стола. Чашки с посевами оставляют до затвердевания агара. Культивируют в термостате при 28-30^{0}С в течение 72 часов и подсчитывают количество выросших колоний (вычисляют среднее арифметическое число).

Для подсчета берут разведения, при которых на чашках вырастает от 50 до 150 колоний. Например, из 6-го разведения в чашке выросло 6 колоний, их не учитывают; из 5-го – 55 колоний, из 4-го – 180, из 3-го – 320, а из 2-го сплошной рост – он не учитывается.

Подсчет: 55 * 10 000 000 = 550 000 000

180 * 1 000 000 = 180 000 000

32 * 100 000 = 32 000 000

Сумма: 762 000 000

Среднее арифметические число равно 762 000 000 / 3 = 286 000 000 микроорганизмов в 1 г исследуемой почвы.

Метод прямой микроскопии почвы

является белее достоверным и объективным, однако он очень трудоемкий и требует специальной аппаратуры (см.кн. Ассонов Н. Р. «Практикум по микробиологии», М., «Колос», 1988).

Определение коли-титра почвы

Коли-титром почвы называют наименьшее количество ее в граммах, содержащее кишечную палочку. Для определения коли-титра почвы рекомендуется:

1. Титрационный метод (при невысокой фекальной загрязненности).
2. Метод мембранных фильтров (при анализе малозагрязненных почв).
3. Прямой посев на среду Эндо (при невысокой степени фекальной загрязненности).

Титрационный метод. Наиболее пригодна для этого места среда Кесслера, содержащая генциан фиолетовый. Среду разливают в пробирки с поплавками. Для посева из разведения (1:10) набирают 10 мл суспензии и вносят в колбу с 50 мл среды Кесслера. Из последующих разведений берут по 1 мл суспензии и вносят в пробирку с 9 мл той же среды. Колбы и пробирки культивируют при 37^0С в течение 48 часов. Отсутствие помутнения и газообразования позволяет дать отрицательный результат о наличии БГКП. Если в засеянных сосудах обнаруживается рост культуры в виде помутнения среды и газообразования, то делают посев на среду Эндо или на Розоловый агар (чашки инкубируют при 37^0С в течение 24 часов). Дальнейшей идентификации подвергаются типичные для эшерихий колонии на среде Эндо, а также желтые или оранжевые на Розоловой среде. Результаты анализа выражаются в виде коли-титра. Коли-титр почвы рассчитывают по максимальному разведению, например, рост установлен в разведениях от 1:10 до 1:1000, то коли-титр почвы будет равен 0,001 г.

Метод мембранных фильтров. Метод применяется как ускоренный для определения БГКП. Почвенную суспензию 1:100 центрифугируют в течение 5 мин. и пропускают через мембранные фильтры №3. дальнейший ход исследования такой же, как при определении кишечной палочки в воде.

Прямой посев почвы на среду Эндо. Почва из мест интенсивного фекального загрязнения засеваются в количестве 0,1 и 0,5 мл суспензии, разведенной от 1:10 до 1:1 000 000, в чашке Петри на среду Эндо. Метод прямого посева используется для определения бактериальной обсемененности менее загрязненных почв, в этом случае берется почвенная суспензия в разведении от 1:10 до 1:10 000. Посевы выращивают в термостате при температуре 37^0С в течение 24 часов. Идентификацию выросших колоний проводят по общепринятым методам. Для санитарной оценки почвы пользуются показателями таблицы 3.

Табл. 3. Санитарная оценка почвы по бактериологическим показателям

Почва	Микробное число, млн в 1 грамме	Титр кишечной палочки	Титр анаэробов (*Cl. perfringens*)
Чистая	1-1,5	1,0 и выше	1,0 и выше
Слабозагрязненная	2	0,1-0,01	0,1-0,01
Умеренно загрязненная	2,5-3	0,01-0,001	0,01-0,001
Сильно загрязненная	Свыше 3-5	0,001 и ниже	0,0001 и ниже

Практическая часть

Определение микробного числа почвы методом посева на МПА

1. Взвесить из приготовленного образца 1 г почвы.
2. Приготовить почвенную суспензию (1 г почвы =99 мл стерильной воды – разведение 1:100).
3. Из почвенной суспензии сделать в пробирках последовательные разведения по схеме:
   - 1 мл разведения 1:100 + 9 мл воды – 1:1000;
   - 1 мл разведения 1:1000 + 9 мл воды – 1:10 000;
   - 1 мл разведения 1:10 000 + 9 мл воды – 100 000 и тд.
4. Из последних трех разведений по 1 мл внести в чашки Петри и залить расплавленным и охлажденным МПА, смешав содержимое, дать застыть.
5. Подписать на каждой чашке засеянное разведение и № пробы, поставить в термостат для культивирования при 28-30^{0}С на 72 часа.
6. На следующем занятии определить микробное число почвы: подсчитать количество выросших колоний и умножить на разведение.
7. По среднеарифметическому числу дать заключение о санитарном состоянии почвы.

Вопросы для самопроверки:

1. Какие методы применяются для определения микробного числа почвы?

2. Что определяют при исследовании почвы титрационным методом и посевом на среду Эндо?

3. Что называют микробным числом почвы?

Лабораторная работа № 14

Тема: Практическое применение иммунологических реакций. Реакция агглютинации

Цель занятия: Ознакомиться с сущностью реакции агглютинации, применением ее в ветеринарно-лабораторной практике, получением и подготовкой компонентов; освоить методику постановки реакции агглютинации (РА) классическим (пробирочным) и капельным методами.

Материалы и оборудование: пробирки с ровным сферическим дном, пипетки градуированные на 1 и 5 мл, стерильные пастеровские пипетки и штативы, сыворотка крупного рогатого скота позитивная (бруцеллезная), сыворотка нормальная (здорового) КРС, антиген для РА (единый бруцеллезный), пробирки с физ.раствором, резиновые груши. Демонстрационные таблицы, пробирки с положительной и отрицательной реакцией с молоком (КР).

Порядок выполнения работы:

1. Ознакомиться со схемой и методикой постановки пробирочной и капельной РА по таблицам;

2. Самостоятельно поставить РА пробирочным методом;

3. Изучить технику учета РА по демонстрационным рядам пробирок с положительной, отрицательной и сомнительной РА;

4. Самостоятельно поставить пластинчатую роз-бенгаловую пробу;

5. Сделать выводы по проделанной работе, записать в рабочую тетрадь.

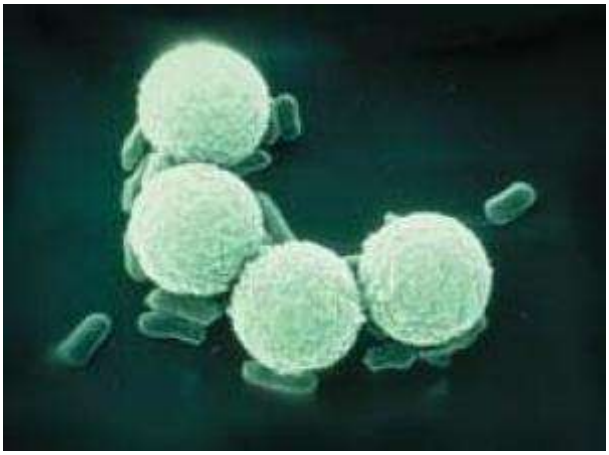
Теоретический материал

Реакции иммунитета – это реакции между антигеном и антителом или между антигеном и сенсебилизированными (приобретшие чувствительность) лимфоцитами, которые происходят в живом организме и могут быть воспроизведены в пробирке. Они легли в основу

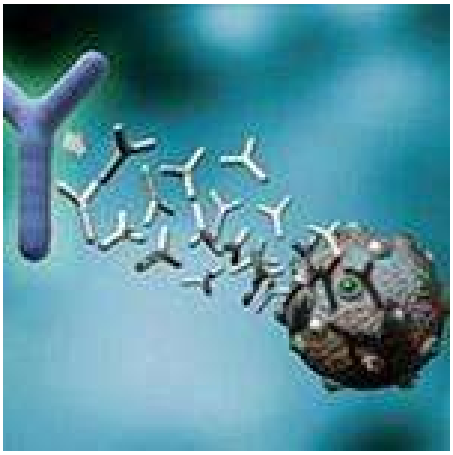
лабораторных методов диагностики инфекционных заболеваний, идентификации и дифференцировки различных микроорганизмов.

Реакции антигена с антителом называются *серологическими* (или *гуморальными*). При взаимодействии антигена и антитела образуется комплекс антиген-антитело (рис. 29). Серологические реакции в диагностических целях применяются: 1) для серодиагностики инфекционных заболеваний, т.е. для определения неизвестных антител с помощью известного антигена; 2) для определения вида антигена микроба с помощью известных диагностических сывороток. Серологические реакции характеризуются специфичностью и чувствительностью. Под *специфичностью* понимают способность антигена реагировать только гомологичными антителами. Чувствительность – это возможность определения минимального количества антигена или антител.

Антигены – это генетически чужеродные вещества, при их введение в организм животного вызывают выработку антител. Различают антигены корпускулярные, или клеточные (микробы, эритроциты), и растворимые (полисахариды, белки и их комплексы). *Антитела* (агглютинины, иммуноглобулины) – высокомолекулярные белки сыворотки крови, образующиеся в организме больных или переболевших животных.



А)



Б)

Рис. 29. Образование комплекса антиген-антитело (А – фото, Б - модель)

Реакция агглютинации (РА)

Реакцию агглютинации ставят с целью обнаружения в исследуемой сыворотке специфических антител по заведомо известной агглютинирующей фабричной сыворотки. При этом в электролитической среде (физ.раствор) происходит склеивание антигенов по специфическим антителам.

РА используют для диагностики бруцеллеза, лептоспироза, сальмонеллеза и др.

РА проявляется в том, что при добавлении сыворотки крови, содержащей специфические антигену антитела, к равномерной взвеси клеток антигена (напр. бактерий) происходит их склеивание, на дне пробирки осадок - *агглютинат*, а жидкость над осадком просветляется.

Методы постановки РА: пробирочный (объемный), капельный (на стекле), антиглобулиновый тест Кумбса, метод адсорбции агглютининов (РА по методу Кастеллани), кольцевая реакция с молоком (КР).

Компоненты постановки РА:

1. Исследуемая сыворотка. Для ее получения берут кровь из яремной или хвостовой вены у животных (КРС, свиньи, олени и др.) по 5-7 мл. Для свертывания крови и отстаивания сыворотки пробирки с кровью выдерживают 30-60 мин. при температуре 20-30°С. сгусток от стенок отделяют стальной спицей, а затем пробирки выдерживают при тем-ре +4,+10°С. Через 20-24 ч отстоявшуюся сыворотку сливают в сухие стерильные пробирки и направляют на исследование в лабораторию. Можно сыворотку консервировать фенолом, мертиолатом, борной кислотой.

2. Известный антиген – взвесь убитых реже живых бактерий в физ. растворе, который готовят на биофабриках.

3. Физиологический раствор – 0,85% раствор NaCI.

Практическая часть

<u>Классический (пробирочный) метод</u> постановки РА (пример на бруцеллез).

<u>Техника постановки РА</u>:

1. В штатив ставят 5 пробирок в ряд, нумеруют.

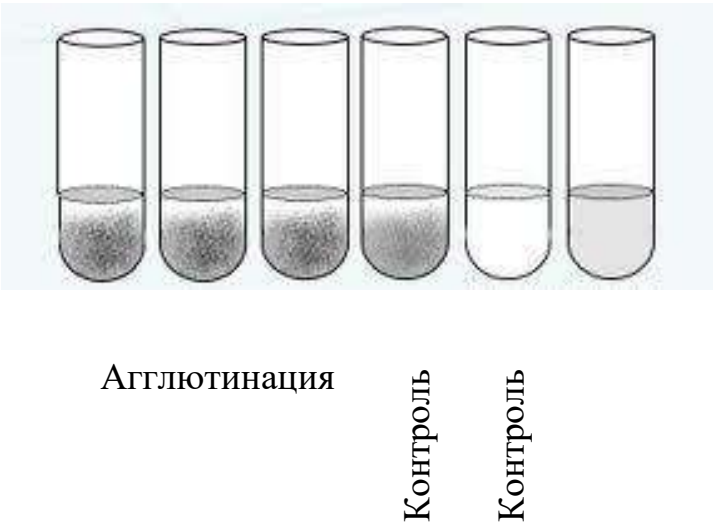


Рис. 30. Реакция агглютинации, пробирочный метод

2. Готовят основное разведение сывороток: в 1-ю пробирку вносят 2,4 мл физраствора и добавляют 0,1 мл сыворотки (получается разведение 1:25).

3. Готовят рабочее разведение каждой пробы сыворотки: в 3-ю, 4-ю, 5-ю пробирки вносят по 0,5 мл физраствора. Затем, по 0,5 мл сыворотки из 1-й пробирки мерной пипеткой переносят во 2-ю и 3-ю пробирки. Из 3-й пробирки 0,5 мл сыворотки переносят в четвертую. Далее из 4-й пробирки 0,5 мл сыворотки переносят в 5-ю пробирку. Из 5-й пробирки 0,5 мл разведенной сыворотки выливают в банку с дезраствором. Таким образом, во 2-й, 3-й, 4-й, 5-й пробирках находиться по 0,5 сыворотки крови, разведенной соответственно 1:25, 1:50, 1:100, 1:200.

4. Антиген разводят физраствором до нужной концентрации (бруцеллезный антиген разводят 1: 10, 1 млд микробных тел в 1 мл).

5. В пробирки с разведенными сыворотками (№№ 2, 3, 4, 5) вносят разведенный антиген по 0,5 мл градуированной пипеткой. В 1-ю пробирку антиген не добавляют, она служит контрольной.

6. Штатив с пробирками осторожно встряхивают и помещают в термостат на 16-20 ч (37-38ºС), затем 1-2 ч выдерживают при комнатной температуре, после учитываю реакцию агглютинации (рис. 30).

Учет РА

Учет РА проводят невооруженным глазом (или с пом. агглютиноскопа) в каждой пробирке, начиная с контрольных. При наличии в 1-й пробирке хлопьев, эритроцитов и др. примесей РА не учитывают. Если сыворотка в 1-й пробирке прозрачная, то результаты РА учитывают в крестах по схеме:

++++ полное просветление жидкости над полностью осевшим на дно пробирки агглютинатом в виде раскрытого перевернутого белого кружевного зонтика.

+++ неполное просветление жидкости, но хорошо выраженный «зонтик».

++ слабое просветление жидкости, «зонтик» умеренно выражен.

+ просветление отсутствует, «зонтик» слабо выражен.

– муть, «зонтик» отсутствует.

Показатели агглютинации в пробирках на 2, 3, 4 креста характеризуются как положительная реакция.

Пластинчатая роз-бенгаловая проба (РПБ), разновидность РА, в которой антиген подкрашен розовым красителем

1. Сыворотку крови в объеме 0,3 мл вносят на дно лунки эмалированной пластины;

2. Другой пипеткой вносят 0,03 мл антигена, окрашенного бенгальским розовым;

3. Смешивать в течение 4 мин.

Одновременно ставят контроли антигена с позитивной и негативной сыворотками, физраствором.

При положительной реакции в течение этого времени появляются розовые хлопья агглютината. Отсутствие агглютината – отрицательная РПБ.

Вопросы для самоконтроля:

1. Какие реакции называются серологическим?
2. Что такое антиген?
3. Что такое антитела?
4. Что диагностируют с помощью РА?
5. Что такое контроль в РА?

Лабораторная работа № 15

Тема: Реакции преципитации

Цель занятия: Ознакомиться с сущностью реакции преципитации, применением ее в ветеринарно-лабораторной практике; освоить методику постановки реакции преципитации (РП).

Материалы и оборудование: Пробирки с РА, поставленной на предыдущем занятии. Пробирки с экстрагированным антигеном, с преципитирующий сывороткой, гомологичной антигену, с нормальной сывороткой, преципитационные пробирки (Уленгута) и штативы к ним. Тонкие пастеровские пипетки, резиновые груши, агар в колбах и водяная баня для расплавления агара, предметные стекла, стерильные чашки Петри, эксикаторы. Для демонстрации: готовая РП в агаровом геле, пробойник для создания углублений в агаре, таблицы.

Порядок выполнения работы:

1. Ознакомление со схемой и методикой постановки РП;
2. Конспектирование теоретического материала;
3. Постановка реакции кольцеприципитации;
4. Постановка диффузной преципитации в агаровом геле на предметном стекле и в чашках Петри.

Теоретический материал

Реакция преципитации (РП) основана на том, что при соединении антигена (преципитиногена) со специфическими антителами (преципитинами) образуется осадок преципитат. В отличие от реакции агглютинации антигеном для реакции преципитации служат растворимые соединения, величина частичек которых приближается к размерам молекул. Это могут быть белки, комплексы белков с углеводами и липидами, бактериальные экстракты, фильтраты бульонных культур микробов. Реакция преципитации является очень чувствительным методом

и ее применяют при исследовании различных белковых и полисахаридных антигенов в судебно- медицинской практике для определения видовой принадлежности пятен крови, спермы, сыворотки, имеющихся на белье и различных предметах. Эту реакцию можно также использовать для выявления различных примесей к молоку, рыбным и мясным продуктам, определения природы белков.

Для получения антигенов для РП необходимо разрушение оболочки бактериальных клеток или клеток тканей при котором освобождается содержимое клетки. Методы получения антигенов для РП: 1. Физические (механическое разрушение бактериальных клеток, замораживание и оттаивание, метод звуковых колебаний, кипячение); 1. Химические (аутолиз бактериальных клеток, их разрушение ферментами, высушиванием в ацетоне и др.).

Реакция кольцепреципитации

РКП - наиболее распространенный способ постановки ПР (рис. 31). Ее используют при диагностике сибирской язвы, чумы, туляремии, менингита.

Метод постановки реакции кольцепреципитации:

1. В узкие преципитационные пробирки разливают специфическую иммунную преципитирующую сыворотку 0,3-0,4 мл.

2. На нее очень осторожно наслаивают антиген 0,3-0,4 мл.

3. Появление в теч. 1-2 мин. на границе двух жидкостей беловатого кольца — преципитата свидетельствует о наличии соответствующего антигена.

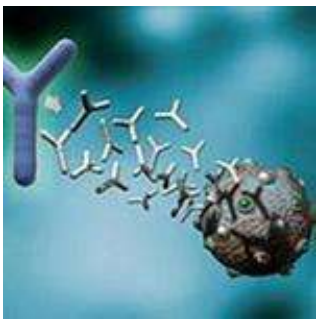


Рис. 31. Реакция преципитации

Реакция диффузной преципитации (РДП)

РДП позволяет детально изучить состав сложных водорастворимых антигенных смесей. Для постановки реакции используют гель (полужидкий или более густой агар). Каждый компонент, входящий в состав антигена, диффундирует навстречу соответствующему антителу с разной скоростью. Поэтому комплексы различных антигенов и соответствующих антител располагаются в разных участках геля, где и образуются линии преципитации. Каждая из линий соответствует только одному комплексу антиген-антитело.

Метод постановки РДП

В застывшем на чашках Петри или на предметном стекле агаровом геле делают углубления на некотором расстоянии друг от друга (4 мм). В одну из них вносят специфическую сыворотку, в другие, расположенные вокруг первой, - разные пробы антигена (исследуемый материал). Оба компонента в луночках (сыворотка и исследуемый материал) диффундируют во встречном направлении в слое агара. На месте встречи специфических антиген-антитело выпадает сероватый преципитат в виде полосок, линий.

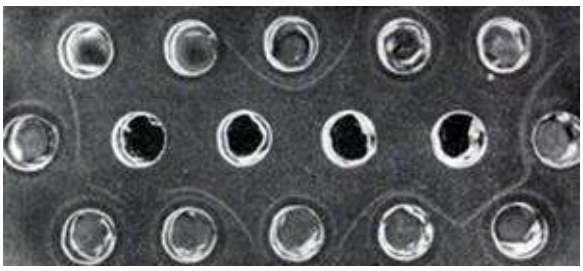


Рис. 32. Реакция диффузной преципитации, линии преципитации

С помощью РДП можно обнаруживать антитела в сыворотке крови и определять их титр. В этом случае в центральную лунку вносят известный растворимый антиген (бактериальный, вирусный), а в переферические – различные разведения исследуемой сыворотки крови.

Для постановки РП среда должна быть нейтральной. В кислой среде образуется неспецифический осадок; щелочная среда тормозит проявление специфической РП.

Метод иммуноэлектрофореза

получил широкое распространение в последние годы при исследовании антигенной структуры микробов. Комплекс антигенов помещают в луночку, которая находится в центре агарового геля, залитого на пластинку. Затем через агаровый гель пропускают электрический ток, в результате чего различные антигены, входящие в комплекс, перемещаются в поле электрического тока в зависимости от их электрофоретической подвижности. После окончания электрофореза в траншею, расположенную по краю пластинки, вносят специфическую иммунную сыворотку и помещают во влажную камеру. В местах образования комплекса антиген — антитело появляются линии преципитации.

Вопросы для самоконтроля:

1. Что такое реакция преципитации, ее применение?
2. Отличие РП от РА.
3. Методы постановки РП.

4. Как проводят реакцию кольцепреципитации?

5. Как ставят реакцию диффузной преципитации?

6. В чем заключается метод иммуноэлектрофореза?

Лабораторная работа № 16

Тема: Патогенные кокки. Стафилококки

Цель занятия: Изучить морфологические свойства стафилококков, стрептококков, диплококков. Усвоить, какой патологический материал направляют в ветеринарную лабораторию. Ознакомиться с питательными средами, методами выделения и культивирования стафилококков, методами дифференциации патогенных и непатогенных стафилококков.

Материалы и оборудование: воспалительный экссудат (гной) от больного животного, питательные среды, таблица морфологии кокков.

Порядок выполнения работы:

1. Изучить и законспектировать теоретический материал;
2. Приготовить бактериологический препарат из гноя;
3. Окрасить препарат простым методом или по Граму;
4. Рассмотреть мазок с помощью иммерсионного объектива;
5. Увиденную картину зарисовать в рабочей тетради;
6. Сделать вывод по проделанной лабораторной работе.

Теоретический материал

Стафилококки – микроорганизмы шаровидной формы, относятся к роду *Staphylococcus*. Патогенные кокки являются возбудителями инфекционных заболеваний, причиной пищевых отравлений у человека. Вызывают гнойно- воспалительные процессы (фурункулы, карбункулы, флегмоны, абсцессы и др.). Инфекционные процессы, обусловленные стафилококками (и стрептококками), сопровождаются образованием гноя (их называют гноеродными).

Патологическим материалом

при стафилококков является раневой экссудат и гной, при мастите - молоко. Мастит у коров вызывает маститный стрептококк.Молоко исследуют не позднее 2-х часов с момента взятие пробы. Мытный

стрептококк вызывает мыт молодых лошадей до 2-х лет. Для исследования берут гнойное истечение из носовых отверстий, абсцессов. Диплококковую инфекцию у телят, ягнят, поросят вызывают стрептококки. У молодых животных возникает воспаление легких, желудочно -кишечного тракта у взрослых животных гнойное воспаление матки и вымени.

Забор патологического материала

При открытых ранах содержимое берут стерильным ватным тампоном (свернут на конце палочки, вмонтированной в ватную пробку, и вставлен в пробирку). Стерильный тампон пропитывают эскудатом и закрывают в пробирку. Жидкий эскудат можно отобрать пипеткой или шприцем и слить в пробирку. Если абсцесс не вскрыт, то эскудат берут асептически: поверхность дезенфицируют, и делают прокол шприцем с иглой, содержимое выливают в пробирку. Закрытые пробирки с пат. материалом помещают в футляр для отправки в лабораторию.

Микроскопия

Предварительно делают посев, затем готовят мазки. Мазки после высушивания и фиксации окрашивают по Грамму. Видимая картина (рис. 33): клетки шаровидной формы, располагаются различными скоплениями (рис. 34), цепочками, одиночно, при ботриомикозах могут встречаться зооглеи (скопления кокков, окруженных общей капсулой).

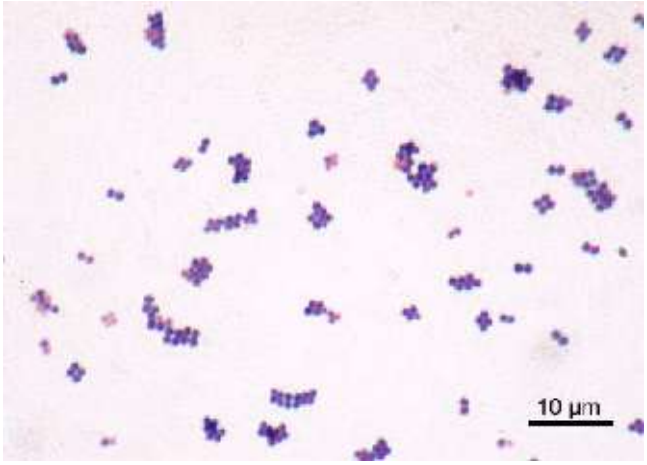


Рис. 33. Стафилококки под микроскопом, мазок, окрашенный по Граму

Стафилококки окрашиваются грамположительно, споры и капсулы не образуются, неподвижные.

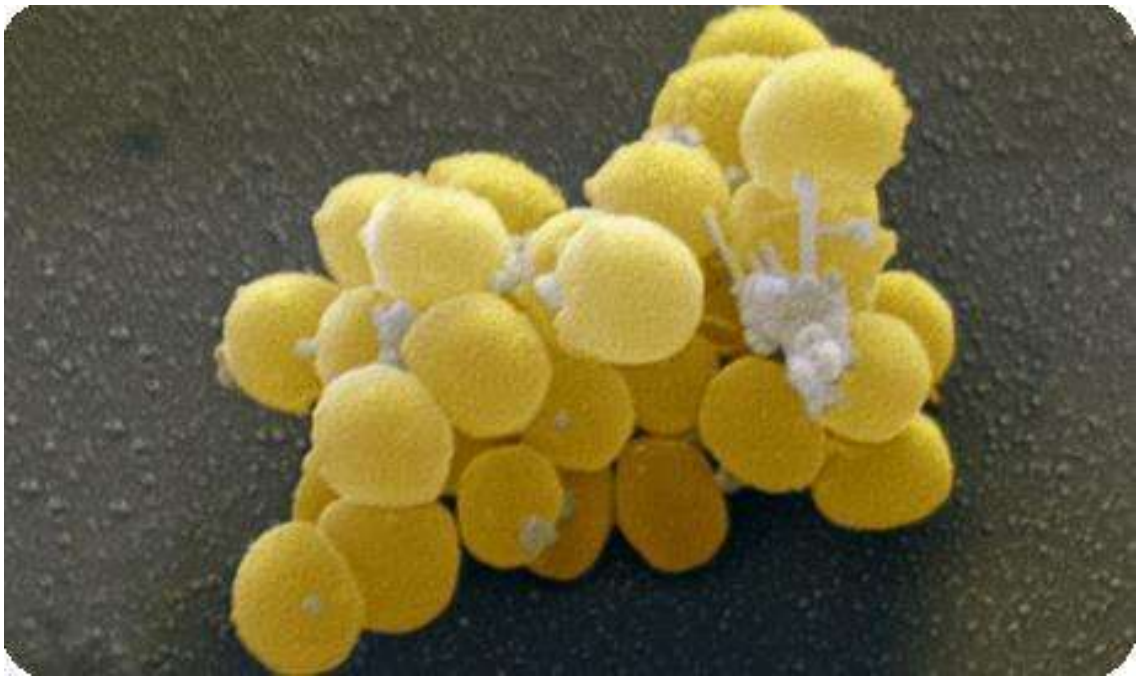


Рис. 34. Золотистый стафилококк

Культивирование и культуральные свойства

С помощью пипетки 1-2 капли эскудата (гноя) наносят на питательные среды. Стафилококки не прихотливы к средам, хорошо растут на МПБ, МПА, РН 7,2-7,4. оптимальная температура – 35-37ºС, аэробы. Необходимо пользоваться селективной средой – солевой кровяной МПА с 8-10% NaCl и 5% дифибринорованной крови. Т.к. стафилококки выдерживают высокие концентрации NaCl (до 16%), другие микроорганизмы в этих условиях не растут.

Культуральные свойства характеризуются помутнением МПБ и обильным осадком, возможно серовато-белое пристеночное кольцо или пленка. На плотных средах (рис. 35) через 12-24 ч инкубирования в термостате вырастают круглые сочные непрозрачные колонии в диаметре 2-4 мм. Цвет зависит от вида стафилококка (буровато-белый, золотистый, кремовый, лимонный). На кровяном агаре образуется зона гемолиза вокруг

колонии (рис. 36). Изолированную колонию с солевого или кровяного МПА пересевают в пробирку со скошенным МПА, выросшую чистую

культуру идентифицируют.

Рис. 35. Посев непатогенных стафилококков на плотной питательной среде

Рис. 36. Гемолиз, вызванный патогенными стафилококками

Ферментативные (биохимические) свойства стафилококков

Имеют диагностическое значение. 1) Стафилококки обладают протеолитическими (расщепление белков) свойствами: МПЖ (в пробирке столбиком) разжижается к пятому дню, также медленно разжижается свернутая кровяная сыворотка; молоко свертывается, затем образовавшийся сгусток казеина пептонизируется. 2) расщепляют лактозу, глюкозу, глицерин, сахарозу, мальтозу, маннит. 3) продуцируют фермент ДНК-азу. 4) продуцируют H2S, аммиак, фермент коагулазы, индол не образуют.

Для дифференциации патогенных и непатогенных стафилококков

1) используют специальную селективную среду с добавлением кристаллвиолета. При этом растут колонии фиолотового или оранжевого цвета патогенных видов. Непатогенные стафилококки не растут.

2) применяют биологическую пробу на лабораторных животных (котята, кролики). Стафилококк разрушает эритроциты и лейкоциты (реакция плазмакоагуляции). Выделяет некротоксин и летальный токсин. Стафилококк вводят внутривенно, подкожно, или с молоком.

Таким образом, *для патогенный стафилококков характерны*: 1) гемолиз, 2) ферментация маннита, 3) ДНК-азная активность, 4) рост в среде с добавлением кристаллвиолета, 5) реакция плазмакоагуляции, 6) некротизирующая способность, 7) наличие летального токсина.

Вопросы для самоконтроля:

1. Как проявляются болезни, вызываемые стафилококками?
2. Какими морфологическими, культуральными и биохимическими особенностями характеризуются стафилококки?
3. Какие методы определения патогенности стафилококков Вы знаете?

Лабораторная работа

Тема: Патогенные стрептококки – возбудители мастита коров и мыта лошадей

Цель занятия: Усвоить правила взятия и пересылки патологического материала при мастите, мыте, ознакомиться и освоить порядок и методы бактериологического исследования. Ознакомиться с питательными средами, методами выделения и культивирования стрептококков, методами дифференциации патогенных и непатогенных стафилококков.

Материалы и оборудование: воспалительный экссудат (молоко, гной) от больного животного, питательные среды, красители, микроскоп, лабораторное оборудование.

Порядок выполнения работы.

1. Изучить и законспектировать теоретический материал;
2. Сделать посев исследуемого материала на питательные среды;
3. Приготовить мазок, зафиксировать его, окрасить по Грамму;
4. Рассмотреть мазок под микроскопом;
5. Зарисовать микроскопическую картину;
6. Сделать вывод по проделанной лабораторной работе.

Теоретический материал

Стрептококки – род *Streptococcus*. Патогенные виды: S. *pyogenes, S. agalactiae, S. equi, S. pneumoniae.* Вызывают инфекционные заболевания, сопровождающиеся гноем.

Возбудитель инфекционного мастита коров –

Классификация: Семейство- Streptococcaceae

Род: Streptococcus

Вид: *S. agalactiae (S. mastitidis)*.

Мастит – гнойное воспаление вымени.

Патологический материал для диагностики – измененный секрет из пораженной доли вымени. Последние его порции после дезинфекции вымени берут из каждого соска в отдельные стерильные пробирки, закрывают пробкой. Молоко исследовать в течении 2 часов.

Микроскопия

В лаборатории делают мазок-препарат, окрашивают его по Граму и микроскопируют. *S. agalactiae* располагается длинными цепочками из сплюснутых кокков (в виде частокола) (рис. 1

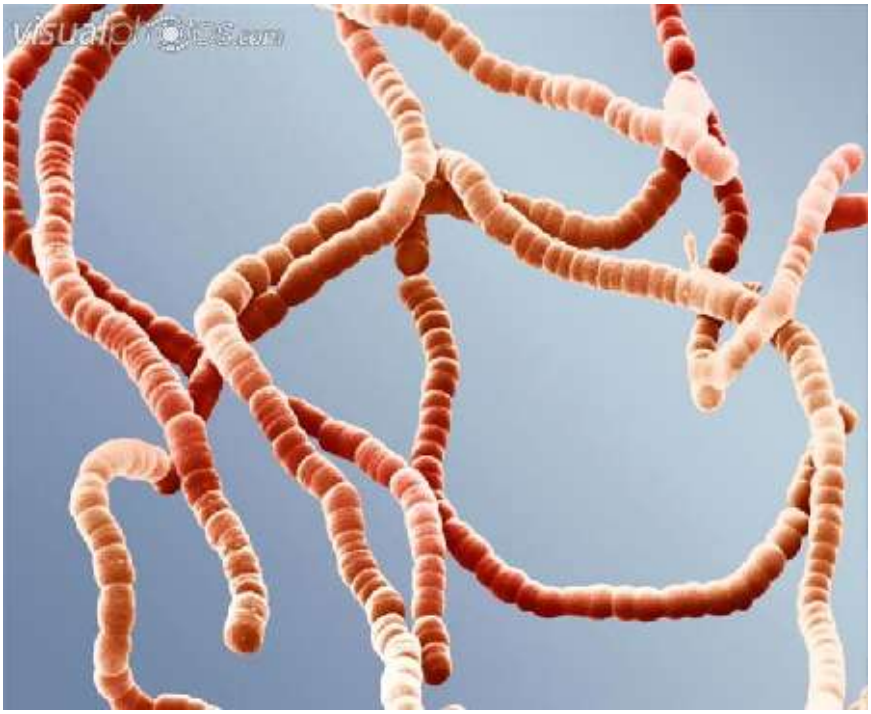


Рис. 1. *S. agalactiae* (внешний вид)

Диаметр кокков 0,5-1 мкм, грамположительные, неподвижные, споры и капсулы не образуют (рис. 38). Дополнительно окрашивают мазок по Романовскому-Гимзе или метиленовым синим и подсчитывают число лейкоцитов, их увеличенное количество говорит о воспалении молочной железы.

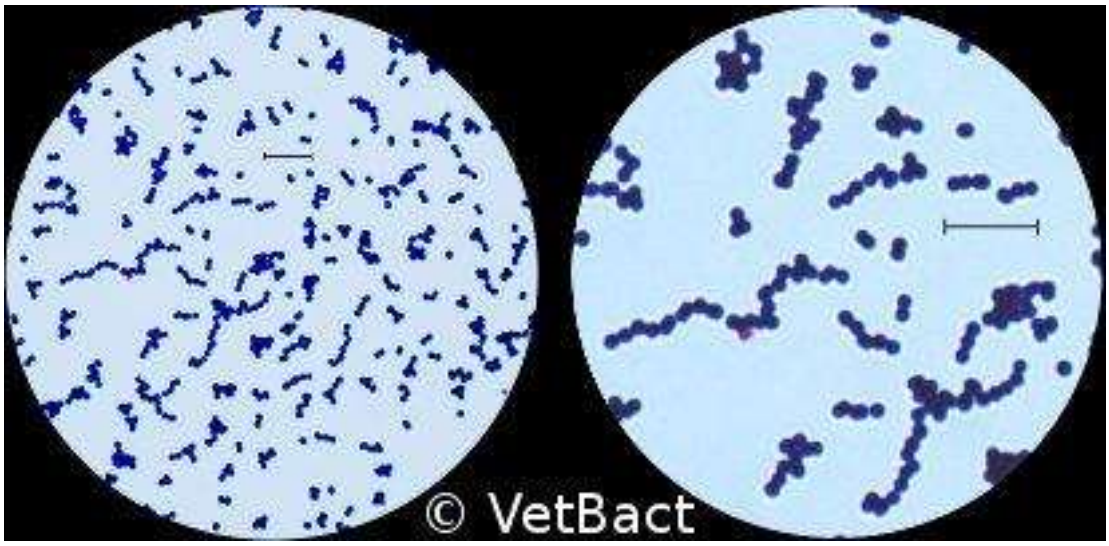


Рис. 2. *S. agalactiae*, изображение в световом микроскопе (увеличение 40 и 90)

Культуральные свойства

Хорошо растут в обычных средах, лучше с добавлением крови. Оптимальная температура 37-38ºС, РН 7,6-7,8. В сывороточном МПБ – в виде крупинчатого осадка на дне пробирки при прозрачности среды; на сывороточном МПБ – в виде сероватых просвечивающихся мелких колоний; на кровяном агаре наблюдается гемолиз.

Рис. 2. Посев *S. agalactiae* на плотной питательной среде

Ферментативные (биохимические) свойства

Агалактийный стрептококк не разжижает МПЖ, не редуцирует и не свертывает метиленовое молоко, лакмусовое молоко изменяет частично. Ферментирует с образованием кислоты углеводы, не ферментирует сорбит и дульцит. Дифференциация агалактийного стрептококка от других стрептококков: CAMP (камп) – проба. На кровяном агаре стафилококк образует вокруг колоний – зоны гемолиза. Если посадить вблизи зоны гемолиза агалактийный стрептококк, то зона гемолиза проявляется ярче.

Патогенность определяют биопробой: внутрибрюшинно заражают белых мышей и морских свинок.

Возбудитель мыта *S. equi*

Мыт – заболевание лошадей (до 2 лет), характеризующиеся катарально гнойным воспалением слизистой оболочки верхних дыхательных путей, глотки, подчелюстных лимфоузлов.

Пат. материал*:* гной из абсцессов, гнойное носовое истечение. В закрытых абсцессах – чистая культура.

Микроскопия. Часть мазков окрашивают по Граму, часть - по Романовскому–Гимзе. Расположены длинными цепочками сплющенных кокков, грамположительные, неподвижны, спор не образует, размер кокков 0,4-1 мкм (рис. 39).

Рис. 39. *S. equi*, изображение в световом микроскопе

Культуральные свойства

На обычных средах не растет. На сывороточно-глюкозном агаре образует мелкие, просвечивающиеся, похожие на капельки росы колонии, характерно слияние колоний. На свернутой кровяной сыворотке – в виде стекловидных сероватых колоний. на кровяном агаре – в виде мелких колоний с зоной β-гемолиза (рис. 40). В среде Китта-Тароцци, сывороточном бульоне – мелкими крупинками, выстилающими дно и стенки пробирки, бульон остается прозрачным.

Рис. 40. Посев *S. equi* на плотной питательной среде

Биохимические свойства

Слабо выражены: молоко не свертывает, лакмус и метиленовый синий не обесцвечивает, не сбраживает лактозу, сорбит, манит, что позволяет дифференцировать его от других стрептококков. S. equi не растет в присутствии мытного антивируса, а все другие стрептококки растут.

Патогенность определяют путем подкожного или внутрибрюшинного заражения белых мышей, кошек, они гибнут через 3-10 дней.

Вопросы для самоконтроля:

4. Как проявляются болезни мыт лошадей и мастит коров?
5. Что является патологическим материалом при мыте лошадей и мастите коров?
6. Какими морфологическими особенностями характеризуются возбудители мыта лошадей и мастита коров?
7. Какими культуральными особенностями характеризуются возбудители мыта лошадей и мастита коров?
8. Какими биохимическими особенностями характеризуются возбудители мыта лошадей и мастита коров?
9. Каким образом проводят серологическую диагностику мыта лошадей и мастита коров?
10. Каково назначение САМР-пробы?

Лабораторная работа № 18

Тема: Возбудитель рожи свиней

Цель занятия: Ознакомиться со свойствами возбудителя рожи свиней, и методами бактериологической диагностики данного заболевания.

Материалы и оборудование: постоянные препараты (мазки-отпечатки) возбудителя рожи свиней; микроскоп.

Порядок выполнения работы.

1. Изучить и законспектировать теоретический материал;
2. Рассмотреть постоянный препарат (мазок-отпечаток) под микроскопом;
3. Зарисовать микроскопическую картину;
4. Сделать вывод по проделанной лабораторной работе.

Теоретический материал

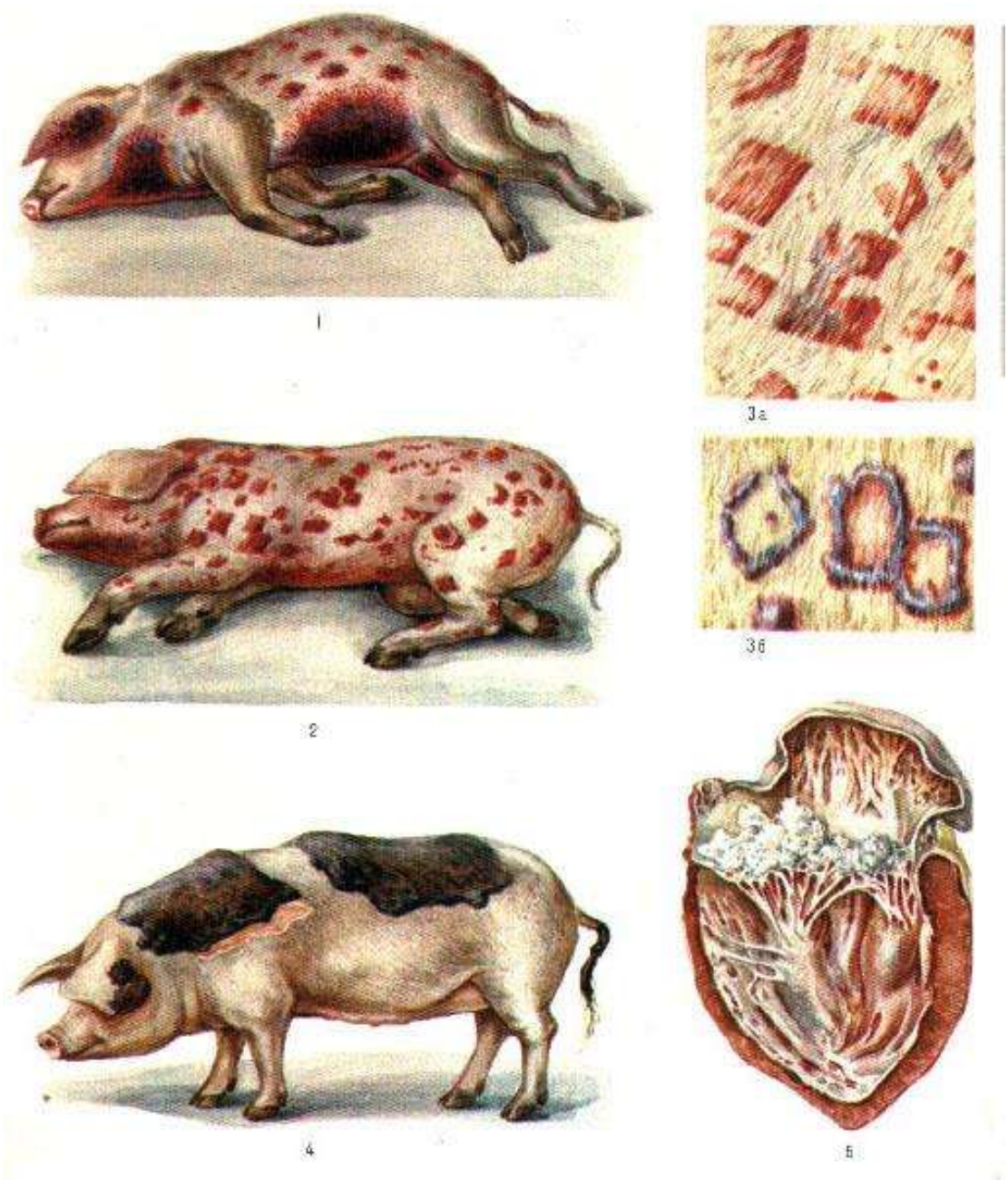
Возбудитель рожи свиней – *Erysipelothrix rhusiopathiae* рода Erysipelothrix сем. Corynebacteriaceae

Вызывает инфекционную болезнь, которая протекает в септической форме, внешне проявляется крапивницей на коже (рис. 41), лихорадкой, при хроническом течении вызывает эндокардит и артрит. Животные чаще болеют в возрасте от 3 мес. до 1 года. К возбудителю чувствительны многие животные и человек.

Патологический материал: труп животного или кусочки органов (печень, селезенка, почки), трубчатая кость; при подозрении на хроническую форму – сердце, суставная жидкость.

Микроскопия: мазки-отпечатки из пат.материала окрашивают по Грамму. В мазках обнаруживают грамположительные палочковидные бактерии, располагающиеся одинарно, попарно или в виде скоплений, в мазках из клапанов сердца видны длинные переплетающиеся нити (рис.

42). При проведении люминисцентной микроскопии (рис. 43) мазки-отпечатки окрашивают методом флуоресцирующих антител, характерно



типичная для возбудителя морфология и контурное свечение бактерий интенсивность не ниже чем на три креста.

Рис. 41. Поражения при роже свиней

1– труп свиньи, павшей при остром течении болезни; 2– труп свиньи, павшей при подостром течении (крапивнице); 3– прямоугольные, ромбовидные эритематозные пятна при крапивнице (а – в начальной стадии, б – в стадии развития); 4– некроз кожи у подсвинка при

хроническом течении болезни; 5– фибринозные наложения на клапанах сердца (бородавчатый эндокардит).

Рис. 42. *Erysipelothrix rhusiopathiae* (световой микроскоп)

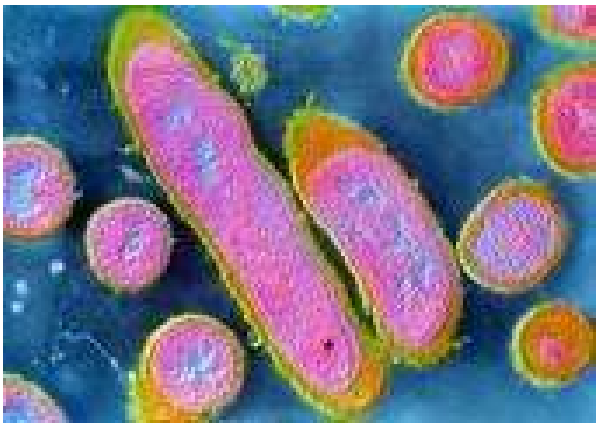
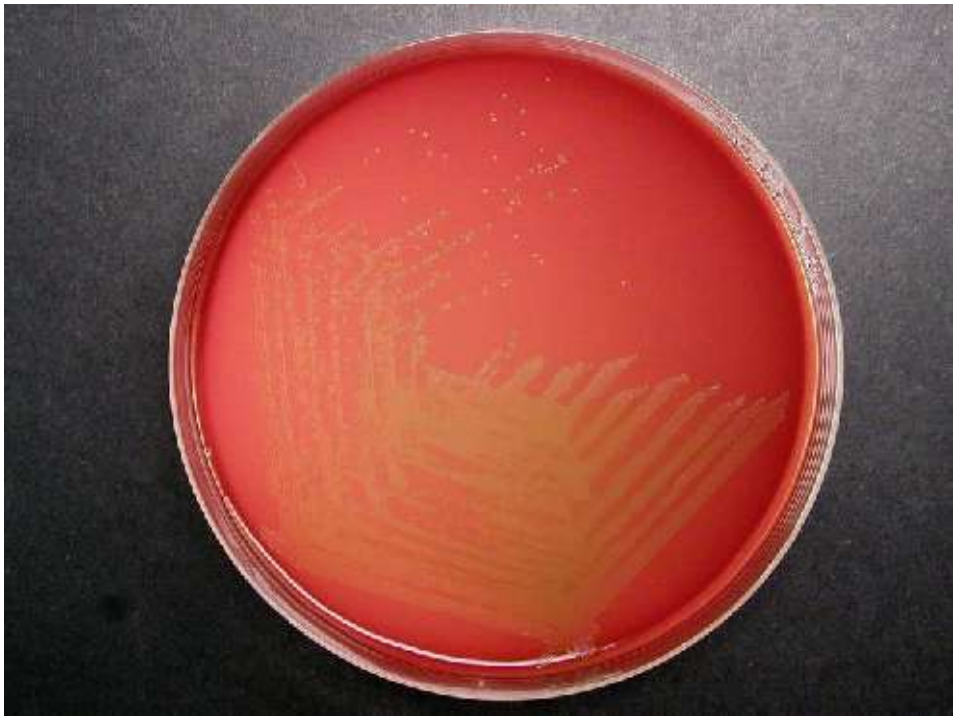


Рис. 43. *Erysipelothrix rhusiopathiae* (макроувеличение)

Культуральные свойства. Растут в МПБ или бульоне Хоттингера, на МПА при температуре 37ºС, рн 7,2-7,6. В жидкой питательной среде через 24-48 ч образуется едва заметное помутнение, затем просветление и осадок, который при встряхивании напоминает облачко либо ленту. На МПА (плотная среда) возбудитель образует: а) S-колонии (рис. 44) - мелкие росинчатые прозрачные (патогенные формы); б) R-формы (рис. 45) – крупные, с неровной волокнистой поверхностью, с отростками (при



хроническом течении болезни).

Рис. 44. S-колонии *Erysipelothrix rhusiopathiae*

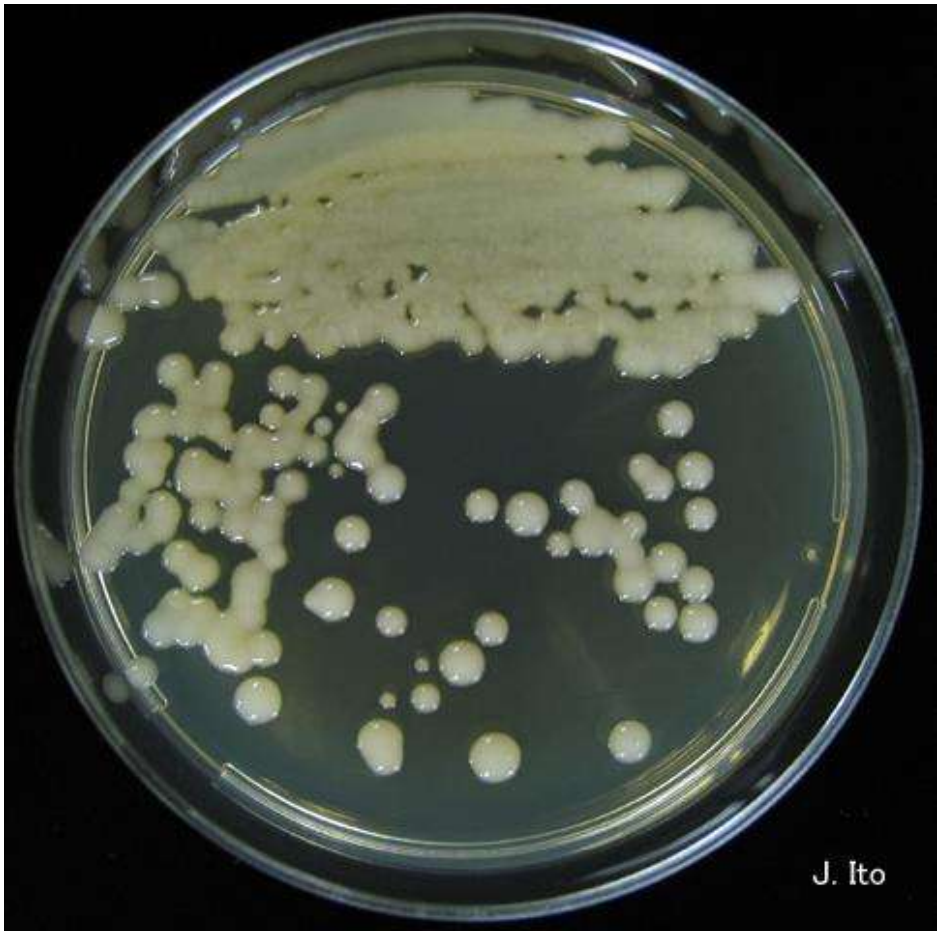


Рис. 45. R-колонии *Erysipelothrix rhusiopathiae*

В мазках из S-колоний – прямые или слегка изогнутые палочки, из R-колоний – цепочки или нити. В МПЖ по уколу посева – рост в виде «ершика» без разжижения среды. В полужидком агаре – пышный рост. Возбудитель неподвижен, спор и капсул не образует.

Биохимические свойства. Возбудитель выделяет сероводород, не образует каталазу, глюкозу и лактозу разлагает с образованием кислоты без газа, не разлагает сахарозу, манит.

Серологическая идентификация. На предметное стекло наносят каплю иммунной противорожистой сыворотки (разведение 1:50), в нее

эмульгируют суточную агаровую культуру, происходит быстрая агглютинация.

Патогенность определяют биопробой: мышам вводят подкожно возбудителя, гибель через 2-4 сут. Из органов павших животных делают посевы для выделения чистой культуры.

Диагноз устанавливают: 1) при обнаружении возбудителя в пат.материале без выделения чистой культуры; 2) при выделении из пат.материала культуры с характерными свойствами на питательных средах; 3) в случае гибели лабораторных животных и выселения из их органов культуры возбудителя, даже если в посевах их исходного материала возбудитель не выделен.

Вопросы для самоконтроля:

11. Как проявляются рожа свиней?
12. Что является патологическим материалом при роже свиней?
13. Какими морфологическими особенностями характеризуются возбудитель рожи свиней?
14. Какими культуральными особенностями характеризуются возбудитель рожи свиней?
15. Какими биохимическими особенностями характеризуются возбудитель рожи свиней?
16. Каким образом проводят серологическую диагностику рожи свиней?

Лабораторная работа № 19

Тема: Энтеробактерии: возбудители эшерихиозов и сальмонеллезов

Цель занятия: Ознакомиться со свойствами возбудителей эшерихиозов и сальмонеллезов, и методами бактериологической диагностики данных заболевании. Усвоить правила отбора и пересылки патологического материала в лабораторию.

Материалы и оборудование: готовые препараты, таблица исследования патологического материала, микроскоп, презентации, рисунки, фотографии возбудителей.

Порядок выполнения работы:

1. Изучить теоретический материал, освоить правила отбора и пересылки пат.материала;
2. Ознакомиться с морфологией возбудителей на постоянных препаратах;
3. Изучить культуральные и биохимические свойства возбудителей;
4. Ознакомиться с методикой серологической идентификации возбудителей.

Теоретический материал

Семейство *Enterobactericeae* включает 14 родов, из которых ветеринарное значение имеют *Escherichia* (вызывают эшерихиозы) и *Salmonella* (вызывают сальмонеллезы).

Возбудитель эшерихиозов (колибактериоза, колиэнтерит) - кишечная палочка ***E. coli***. Колибактериоз сопровождается диареей, обезвоживанием организма, возможна смерть. Болеют преимущественно молодые животные разных видов, человек. *E. coli* вызывает у поросят отечную болезнь, у коров мастит. Наиболее изученный микроб.

Патологический материал: свежий труп или кусочек паренхиматозного органа, отрезок тонкого отдела кишечника

перевязанного с двух сторон. Трупы (целиком) в водонепроницаемой таре, кусочки органов можно консервировать. Исследовать не позднее 4 часов. Соблюдать правила асептики.

В лаборатории: 1. Сделать посев на питательные среды (шпателем, или методом отпечатков), посевы поставить в термостат, через 24 часа вырастают колонии; 2. Сделать мазки-отпечатки из органов, зафиксировать и окрасить по Граму.

Микроскопия (рис. 2): на препаратах «висячая капля» устанавливают подвижность (или ее отсутствие) у бактерий. *E. coli* – подвижен (редко неподвижные варианты) (рис. 46).

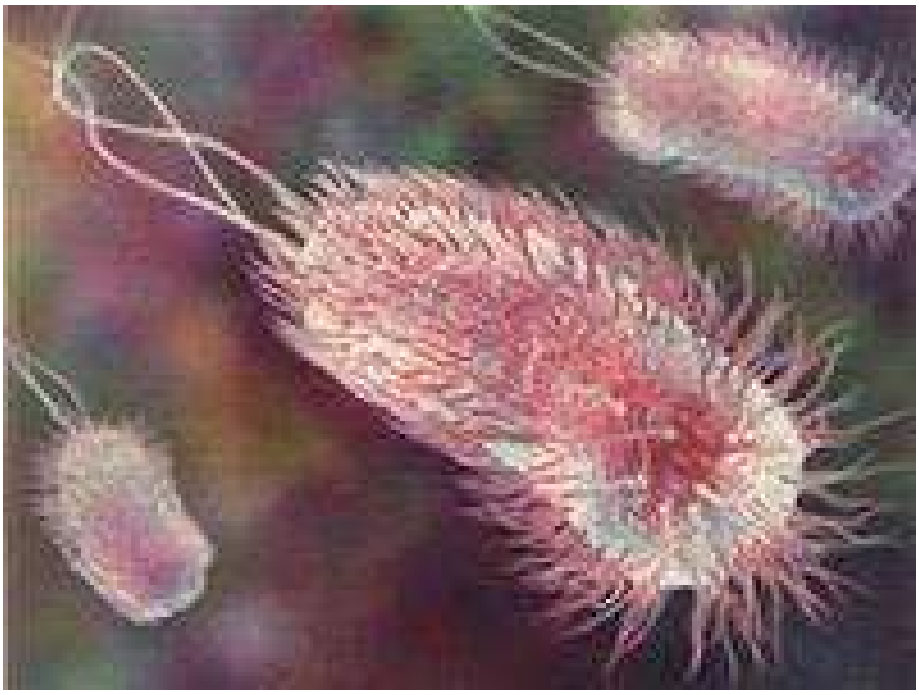


Рис.46. *E. coli* (модель)

Форма палочковидная, грамотрицательный (розово-красный) (рис. 47), спор не образует, капсулы редко. Располагаются одиночно.

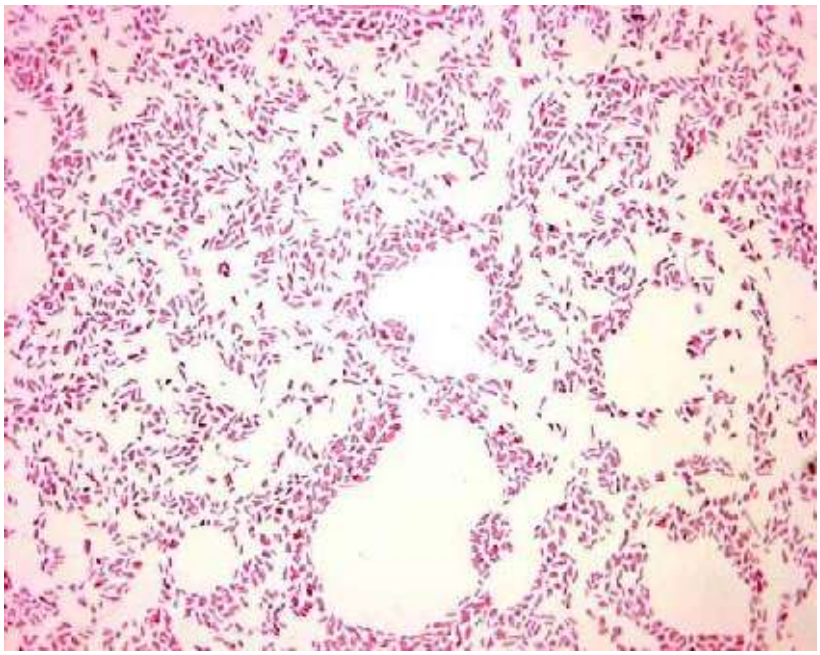


Рис. 47. *E. coli* в световом микроскопе, окрашенный препарат

Культуральные свойства: *E. coli* хорошо растет на обычных средах при 37-38ºС, РН 7,0-7,2. аэробы и факультативные анаэробы. В жидкой среде рост *E. coli* проявляется в виде помутнения с образованием осадка. На МПА через 16-20ч вырастают влажные круглые колонии с ровными краями и гладкой поверхностью, сероватого цвета (рис. 48). Некоторые штаммы обладают гемолитическими свойствами.

Рис. 48. Колонии *E. coli* на МПА (сероватые)

Ферментные (биохимические) свойства: Для дифференциации *E. coli* от других энтеробактерий определяют ее биохимические свойства. На среде Эндо *E. coli* растет в виде малиново-красных, реже розовых, часто с блеском колоний (рис. 49). На среде Левина колонии темно-фиолетовые. *E. coli* сбраживает лактозу, ферментирует манит, дульцит, образует индол, не образует H2S, желатин не разжижает, мочевину не расщепляет.

Рис. 49. Колонии *E. coli* (с металлическим блеском) на среде Эндо

Антигенное строение: Для поведения родовой идентификации энтеробактерий проводят серологическую типизацию в РА (реакция агглютинации) (рис. 5). Культуру, выращенную на скошенном МПА смывают физ.раствором с пробирки, прогревают 1 ч при 100ºС. Центрифугируют, осадок используют как антиген для постановки РА пробирочным методом, или на стекле (рис. 50).

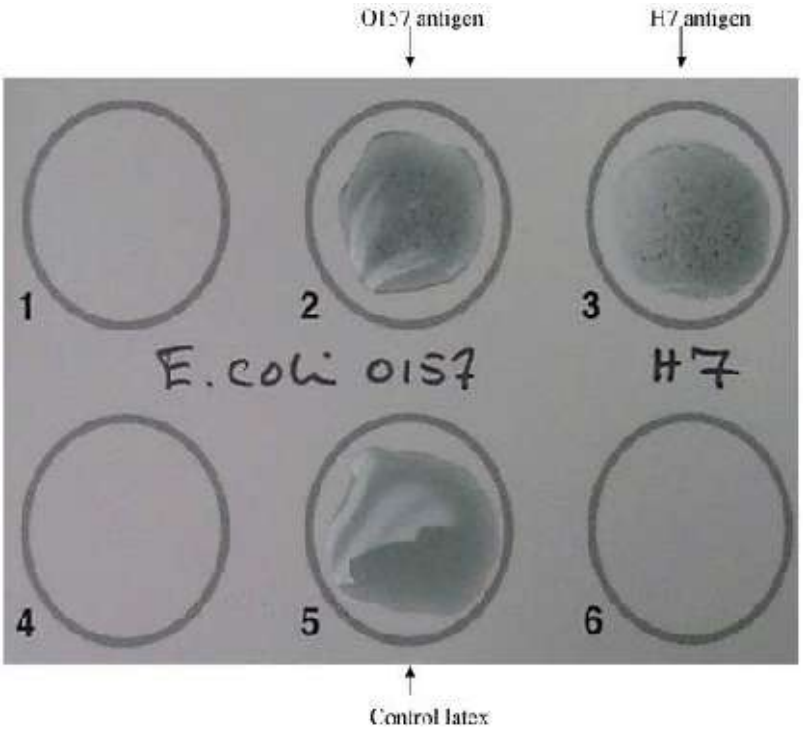


Рис. 50. РА на стекле

Патогенность: Кишечную палочку определяют внутрибрюшинным заражение молодых белых мышей. *E. coli*, выделенные из органов, фекалий и трупов больных животных, патогенны. А от здоровых животных непатогенны.

Род *Salmonella* объединяет более 2000 представителей, широко распространенных в природе. Они вызывают заболевания у человека и животных. К роду сальмонелл относятся возбудители брюшного тифа, паратифов А и В и пищевых токсикоинфекций (рис. 51).

Сальмонеллезом телята болеют с 3-х недель до 4 мес с лихорадкой и диффузным поносом. Поросята болеют до 4 мес., овцы в любом возрасте, у них возможны внутриутробное заражение и аборты, жеребята заражаются внутриутробно, у кобыл – аборты. У птиц – массовость заболевания: гибель циплят и эмбрионов, взрослые – носители, бессимптомно. Могут находиться в мясе, яйцах и др. пищевых продуктах (рис. 6).

Рис. 51. Распространение сальмонеллеза

Морфология (рис. 52). Сальмонеллы представляют собой короткие палочки с закругленными концами, размером в среднем 1—3 мкм. Все они подвижны благодаря наличию жгутиков (рис. 53). Спор и капсул не образуют, грамотрицательны.

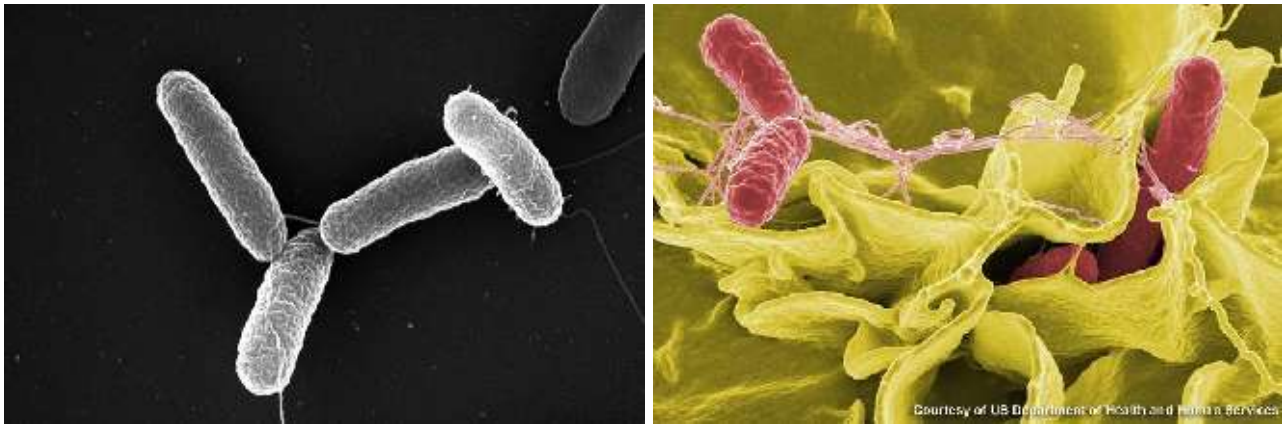


Рис. 52. Сальмонеллы, макрофото

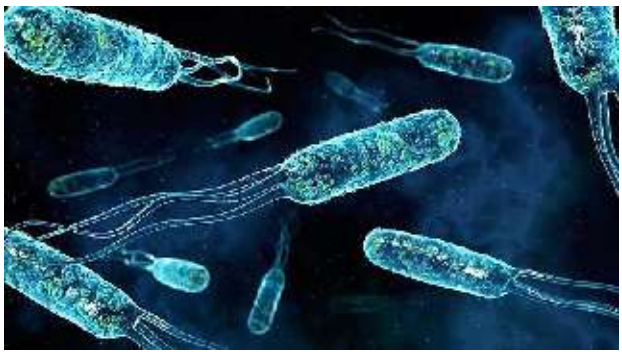


Рис. 53. Сальмонеллы, модель

Культуральные свойства. Факультативные аэробы. Хорошо растут на простых питательных средах при температуре 37°С и pH 7,2—7,4. Па жидких средах дают равномерное помутнение. На МПА колонии более мелкие, чем у кишечных палочек, нежные, полупрозрачные. На средах Эндо, Левина, Плоскирева колонии мелкие, бесцветные. На висмут-сульфит-агаре колонии черного цвета.

Ферментативные свойства. Не разлагают лактозу и сахарозу, ферментируют глюкозу и маннит с образованием кислоты и газа. Большинство сальмонелл расщепляет белки с образованием сероводорода, не образует индола, не разжижает желатина.

Устойчивость. Сальмонеллы устойчивы во внешней среде. В пыли, во льду, в чистой воде сохраняются до 3 мес. При температуре 70°С гибнут в течение 5—10 мин, при 10°С — мгновенно. В соленом и копченом мясе сальмонеллы жизнеспособны 27 мес. В молоке могут размножаться.

Патогенность. Среди сальмонелл встречаются типы, патогенные только для человека: сальмонеллы брюшного тифа, паратифов А и В. Есть типы, вызывающие заболевания только у животных. Большинство же патогенно и для человека, и для животных.

Вопросы для самоконтроля:

1. Как проявляются болезни, вызываемые представителями родов *Escherichia* и *Salmonella*?
2. Что является патологическим материалом при эшерихиозе и сальмонеллезе?
3. Какими морфологическими особенностями характеризуются возбудители эшерихиозов и сальмонеллезов?
4. Какими культуральными особенностями характеризуются возбудители эшерихиозов и сальмонеллезов?
5. Какими биохимическими особенностями характеризуются возбудители эшерихиозов и сальмонеллезов?
6. Каким образом проводят серологическую диагностику эшерихиозов и сальмонеллезов?

Темы рефератов

1. Предмет и задачи микробиологии.
2. Отраслевые направления микробиологии.
3. Краткий исторический очерк развития микробиологии.
4. Система микроорганизмов
5. Физиология микроорганизмов.
6. Наследственность и изменчивость микроорганизмов.
7. Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы.
8. Распространение микроорганизмов в природе.
9. Роль микроорганизмов в круговоте веществ в природе.
10. Морфология микроорганизмов.
11. Культивирование бактерий.
12. Метаболизм микроорганизмов.
13. Влияние факторов внешней среды и биологических факторов на микроорганизмы.
14. Иммунологический статус животных.
15. Классификация, свойства и природа антигенов.
16. Иммуноглобулины и их характеристика.
17. Биопрепараты.
18. Получение и контроль вакцин, лечебных сывороток.
19. Характеристика возбудителей (конкретное название возбудителей заболеваний).
20. Особенности отбора и подготовка пат.материала для бак.диагностики при туберкулёзе.
22. Возбудители микозов (микотоксикозов).
23. Грамположительные кокки.
24. Грамположительные палочки, не образующие споры.
25. Грамположительные спорообразующие палочки.
26. Патогенные анаэробы.

Вопросы для тестирования

1. Какой фактор не относиться к физическим:
2. Как называется температура, при которой вид наиболее хорошо развивается?
3. Как называются теплолюбивые микроорганизмы?
4. Как называются холодолюбивые микроорганизмы?
5. Как называются нагревание продукта при температуре 63-80°С в течение 20-40 мин?
6. В чем не проводят стерилизацию?
7. Как называются влаголюбивые микроорганизмы?
8. Как называются сухолюбивые микроорганизмы?
9. Как называются микроорганизмы, живущие при широком солевом диапазоне?
10. Как называются микроорганизмы, живущие при узком солевом диапазоне?
11. Что не относиться к лучистой энергии?
12. При каких условиях живут барофильные микробы?:
13. К каким факторам относятся антисептические вещества?
14. Какие вещества относятся к антисептическим веществам?
15. Что такое биологические факторы?
16. Что такое бактериофаги?
17. Какую роль выполняют микроорганизмы в круговороте веществ?
18. Какое вещество атмосферы связывают растения?
19. Что образуется в результате процесса фотосинтеза?
20. Какие бактерии осуществляют фиксацию атмосферного азота?
21. Что такое денитрификация?
22. Где в природе происходит образование сероводорода?
23. В чем находятся фосфорные бактерии?
24. Где живут железобактерии?

25. Какая наука изучает взаимоотношение организмов между собой и с окружающей средой?
26. Что такое гумус?
27. Чем характеризуются патогенные микроорганизмы?
28. От чего зависит численность микробов в воде?
29. В какое время года наблюдается максимальное количество микробов в воздухе?
30. В какое время года наблюдается минимальное количество микробов в воздухе?
31. Чем характеризуется инкубационный период инфекционной болезни?
32. Как называется распространение инфекции на всех континентах?
33. Как называется способность микроорганизмов вызывать патологические изменения в тканях и органах макроорганизма?
34. Как называется степень патогенности микроорганизмов?

Вопросы, выносимые на экзамен

1. Систематика микроорганизмов.
2. Морфология бактерий.
3. Строение бактериальной клетки.
4. Рост и размножение бактерий.
5. Питание бактерий.
6. Генетика микроорганизмов, изменчивость у бактерий.
7. Морфология других групп микроорганизмов (актиномицеты, риккетсии, хламидии, микоплазмы).
8. Морфология и систематика грибов.
9. Строение клетки эукариот (грибов).
10. Строение тела гриба.
11. Дрожжи.
12. Влияние физических факторов окружающей среды на микроорганизмы.
13. Влияние химических факторов окружающей среды на микроорганизмы.
14. Влияние биологических факторов окружающей среды на микроорганизмы.
15. Роль микроорганизмов в круговороте веществ в природе.
16. Круговорот углерода.
17. Круговорот азота.
18. Круговорот серы и железа.
19. Микробиология почвы и навоза.
20. Микрофлора воды.
21. Микрофлора воздуха.
22. Микрофлора организма животных.
23. Понятия инфекция, инфекционный процесс, инфекционная болезнь, периоды инфекционного процесса.

24. Пути внедрения в организм и распространение в нем патогенных микробов.

25. Формы инфекций.

26. Понятия патогенность, вирулентность, инвазивность, токсикогенность.

27. Факторы патогенности микробов.

28. Иммунитет и его виды.

29. Антигены и антитела.

30. иммунологические реакции.

31. Биопрепараты, вакцины, иммунные сыворотки.

32. Возбудители бактериальных инфекций: бруцеллез, туберкулез.

33. Возбудители бактериальных инфекций: рожа свиней, мастит коров.

34. Санитарно-показательные микроорганизмы.

35. Микробиологическое исследование воды.

36. Микробиологическое исследование почвы.

37. Микробиологическое исследование воздуха.

38. Санитарная оценка микрофлоры кормов.

39. Возбудители кормовых токсикоинфекций и токсикозов.

40. Санитарная оценка микрофлоры молока и молочных продуктов.

41. Бактериологическая лаборатория и техника безопасности работы в ней.

42. Простой способ окрашивание бактериальных препаратов.

43. Сложные способы окрашивания бактериальных препаратов: окраска по Грамму.

44. Сложные способы окрашивания бактериальных препаратов: окраска спор.

45. Исследование подвижности у бактерий.

46. Морфология грибов.

47. Методы стерилизации.
48. Питательные среды: техника приготовления.
49. Техника посева и выращивания микроорганизмов.
50. Определение культуральных свойств микроорганизмов.
51. Микробиологическое исследование воздуха.
52. Микробиологическое исследование воды.
53. Микробиологическое исследование почвы.
54. Иммунологические реакции: реакция агглютинации.
55. Возбудители колибактериозов.
56. Возбудители сальмонеллезов.

Рекомендуемая литература

Основная литература

1.Госманов, Р.Г. Микробиология и иммунология : учеб. пособие / Р.Г. Госманов, А.И. Ибрагимова, А.К. Галиуллин. - 2-е изд., перераб. и доп. - СПб.: Лань, 2013. - 240 с.

2.Госманов, Р.Г. Микробиология и иммунология [Электронный ресурс]: учеб. пособие / Р.Г. Госманов, А.И. Ибрагимова, А.К. Галиуллин. - Электрон. текст. дан. – СПб.: Лань, 2013. – 240 с. - Режим доступа: (www. e. Lanbook.com)

Дополнительная литература

1. Антонов Б.И., Борисова В.В., Волкова П.М. Лабораторные исследования в ветеринарии / Справочник. М.: Агропромиздат, 1986.

2. Борисова Л.Б., Смирнова А.М. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. - М.: Медицина, 1994.

3. Караулова А.В. Клиническая иммунология. М.: МИА, 1999.

4. Козловский Е.В., Емельяненко П.А. Ветеринарная микробиология. - М.: Колос, 1982.

5. Костенко Т.С., Скаршевская Е.И., Пительсон С.С. Практикум по ветеринарной микробиологии. - М.: Колос, 1989.

6. Осидзе Д.Ф. Ветеринарные биопрепараты. - М.: Колос,1981.

7. Петров Р.В. Иммунология. - М.: Медицина 1987.

8. Радука Н.А. Ветеринарная микробиология и иммунология. М.: Агропромиздат, 1991.

9. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология (перевод с англ.). - М.: Мир, 2000.

10. Сидоров М.А., Скородумов Д.И., Федотов В.Б. Определитель зоопатогенных микроорганизмов. - М.: Колос, 1995.

11. Соколова Е.И. Клиническая иммунология / Руководство для врачей. - М.: Медицина, 1998.

Список использованной литературы

1. Аникеев В.В., Лукомская К.А. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – М.: Просвещение, 1983, - 127 с.

2. Асонов Н.Р. Практикум по микробиологии. – М.: Агропромиздат, 1988, - 155 с.

3. Бузолева Л.С. Микробиологическая оценка качества природных вод, летняя учебно-полевая практика. – Владивосток: Морской Государственный университет, 2011, 88 с.

4. Кисленко В.Н. Практикум по ветеринарной микрообиологии и иммунологии. – М.: КолосС, 2005. -232 с.

5. Колычев Н.М., Госманов Р.Г. Ветеринарная микробиология и иммунология. – м.: КолосС, 2006. – 432 с.

6. Костенко Т.С., Скаршевская Е.И., Гительсон С.С. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. – М.: Агропромиздат, 1989. – 272 с.

7. Костенко Т.С., Родионова В.Б., Скородумов Д.И. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. – М.: Колос, 2001. – 344 с.

8. Радчук Н.А., Дунаев Г.В., Колычев Н.М., Смирнова Н.И. Ветеринарная микробиология и иммунология. – М.: Агропромиздат, 1991. – 383 с.

9. Фролова Н.С. Микробиология: методические указания для проведения лабораторных работ по разделу «Санитарная микробиология». – Уссурийск: ПГСХА, 2012, - 35 с.

СОДЕРЖАНИЕ

Стр.

Введение 3

Лабораторная работа № 1. Правила работы и техника безопасности при работе в лаборатории. Методы исследования микроорганизмов. Виды микроскопии. Устройство микроскопа 5

Лабораторная работа № 2. Морфология бактерий. Приготовление бактериальных препаратов. Простой метод окраски 9

Лабораторная работа № 3. Сложные методы окраски: окраска по Граму 12

Лабораторная работа № 4. Сложные методы окраски: окраска спор 15

Лабораторная работа № 5. Определение подвижности у бактерий 21

Лабораторная работа № 6. Морфология грибов 24

Приложение к лабораторной работе № 6: Морфологическое разнообразие микроскопических грибов 30

Приложение к лабораторной работе № 6: Ключ для определения рода грибов 34

Лабораторная работа № 7. Стерилизация 37

Лабораторная работа № 8. Питательные среды. Техника приготовления питательных сред 42

Лабораторная работа № 9. Техника посева и выращивания микроорганизмов 46

Лабораторная работа № 10. Культуральные свойства микроорганизмов 49

Приложение к лабораторной работе № 10: Определение качественного состава микроорганизмов по культуральным и морфологическим признакам 53

Лабораторная работа № 11. Микробиологическое исследование воздуха, воды: постановка 59

Лабораторная работа № 12. Микробиологическое исследование воздуха, воды: учет 65
Лабораторная работа № 13. Микробиологическое исследование почвы 68
Лабораторная работа № 14. Практическое применение иммунологических реакций. Реакция агглютинации 76
Лабораторная работа № 15. Реакции преципитации 82
Лабораторная работа № 16. Патогенные кокки. Стафилококки 86
Лабораторная работа № 17. Патогенные стрептококки – возбудители мастита коров и мыта лошадей 91
Лабораторная работа № 18. Возбудитель рожи свиней 99
Лабораторная работа № 19. Энтеробактерии: возбудители эшерихиозов и сальмонеллезов 102
Темы рефератов 110
Вопросы для тестирования 111
Контрольные вопросы, выносимые на экзамен 113
Рекомендуемая литература 116
Дополнительная литература 116
Список использованной литературы 117

Бусарова Олеся Юрьевна

Фролова Наталья Степановна

Микробиология и иммунология: учебное пособие для проведения лабораторных и самостоятельных работ для обучающихся по направлению подготовки 36.03.02 Зоотехния всех форм обучения

ЭЛЕКТРОННОЕ ИЗДАНИЕ

ФГБОУ ВО Приморская ГСХА

692510, г. Уссурийск, пр. Блюхера, 44