

## МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ К МОДУЛЮ № 1

### **Тема 1. Техника безопасности при работе в микробиологической лаборатории. Микробиологическая лаборатория и ее оборудование. Микробиологические методы исследований. Устройство микроскопа и правила работы с ним**

**Цель занятия:** ознакомиться с техникой безопасности и правилами работы в микробиологической лаборатории, ее оборудованием. Изучить микробиологические методы исследований микроорганизмов. Ознакомиться с устройством микроскопа и правилами микроскопии.

**Материалы и оборудование:** микроскоп; кедровое масло; готовые окрашенные препараты-мазки с разными микроорганизмами; методические указания по технике безопасности при работе в микробиологической лаборатории; журнал по технике безопасности.

**Задание 1.** Изучить устройство микроскопа и правила работы с ним, особенность работы с иммерсионным объективом.

**Задание 2.** Рассмотреть под микроскопом готовые препараты. Зарисовать микроскопическую картину в тетрадь.

#### **Техника безопасности и правила при работе в микробиологической лаборатории:**

1. Заходить и работать в микробиологической лаборатории только в халате и шапочке (косынке).
2. Не вносить в лабораторию посторонних вещей.
3. Работать на одном и том же месте и пользоваться закрепленным оборудованием.
4. Соблюдать чистоту и порядок при работе.
5. Не курить, не принимать пищу.
6. На рабочем месте должно быть размещено только необходимое для выполнения конкретной работы оборудование.
7. Во избежание взрыва не зажигать одну горелку или спиртовку от другой.
8. Не соприкасаться металлическими и другими предметами контактных частей электросети. Перед работой проверить исправность оборудования.
9. Соблюдать правила работы с химическими реактивами.
10. Приступать к работе только с разрешения преподавателя.
11. При работе с исследуемой культурой бактерий соблюдать осторожность и придерживаться приемов, исключающих возможность заражения.
12. При работе с жидкой микробной культурой использовать резиновые груши, соединенные с пипеткой.
13. Если исследуемый материал попал на стол, удалить его тампоном, смоченным дезраствором. Если разбили пробирку – сообщите преподавателю.

14. По окончании работы исследуемый материал и инструменты обеззаразить.

15. В конце работы привести в порядок рабочее место, поставить микроскопы в шкаф (помните, что нести их нужно двумя руками: правой держать за стойку, а левой поддерживать за основание).

16. Перед уходом из лаборатории снять халат и шапочку, тщательно вымыть руки.

**Микробиологическая лаборатория.** В микробиологической лаборатории студенты овладевают методами микроскопических, микробиологических и других исследований, проводят научно-исследовательскую работу, знакомятся с основными вопросами, предусмотренными программой по микробиологии.

Лаборатория должна быть просторной, теплой, снабжена холодной и горячей водой, электричеством. Стены, полы и двери должны быть выполнены из материалов, которые хорошо поддаются мойке и дезинфекции. Они должны быть гладкими без выступов, ниш и острых углов.

Столы для работы располагаются у окон, чтобы было максимум света и удобств. Их покрывают линолеумом, пластиком или стеклом. Вдоль стола, посередине, ставят штативы для пробирок, флаконы или капельницы с красителями в штативах-колодках, восковые карандаши, газовые горелки или спиртовки. Чашки сливные с мостиками ставят каждому студенту. Над столами монтируют освещение, которое должно приближаться к естественному или быть матовым.

Для обеспечения работы лаборатории надо иметь вспомогательные помещения: моечную, стерилизационную, средоварочную, бокс, препараторскую, термостатную, комнату для оборудования, виварий для содержания подопытных животных.

Моечная должна иметь столы, раковины, электрические или газовые плиты, сушильный, вытяжной и другие шкафы.

Стерилизационная комната (автоклавная) предназначена для обеззараживания отработанного материала, посуды, уничтожения выделенных культур. В ней имеются один или два автоклава, аппарат Коха, печь Пастера.

Средоварочная предназначена для приготовления, разлива, стерилизации и хранения питательных сред. В средоварочной должны быть газовая или электрическая плита, столы, шкафы для хранения компонентов сред, мясной воды, холодильник.

Бокс – помещение, где высевают материал на искусственные питательные среды для получения культуры микроорганизмов.

Препараторская – место для подготовки оснащения к занятиям. Здесь имеется холодильник, весы, дистиллятор, центрифуга.

Термостатная – помещение, где находятся термостаты различных марок и размеров для культивирования микроорганизмов.

Виварий – помещение, где содержатся лабораторные животные, используемые для биологических проб.

Уборку в микробиологической лаборатории необходимо проводить влажным способом, поэтому стены должны быть покрыты масляной краской, облицовочной плиткой. Для дезинфекции используют дезинфицирующие растворы и бактерицидные лампы (БУВ-15, БУВ-30, БУВ-30п, БУВ-60п). Лампы устанавливают на высоте 1,5–2,0 м от пола из расчета одна лампа на 1 м<sup>2</sup> помещения. Обеззараживание воздуха осуществляют в течение 2–3 ч.

Микробиологическая лаборатория должна иметь достаточное количество посуды и других материалов: пробирки; колбы; чашки Петри; цилиндры; пипетки; предметные и покровные стекла; бактериологические петли; пастеровские пипетки; питательные среды; растворы красок для окрашивания препаратов; штативы; спиртовки или газовые горелки; автоклав; водяную баню; аппарат Коха; сушильный шкаф; термостаты; холодильники; дистиллятор; микроскопы; бактериальные фильтры (Зейтца); центрифугу; осветитель ОИ-19; бактерицидные лампы; насос Комовского; анаэроустат; вакуумный эксикатор.

**Методы исследований микроорганизмов.** Микроскопический метод основан на изучении морфологических свойств микробов (форма, размеры, подвижность, наличие капсул и спор, взаиморасположение микробов по отношению друг к другу, отношение к окрашиванию по Граму) в препаратах-мазках и отпечатках при помощи микроскопов.

Микробиологический (бактериологический) метод основан на изучении физиологических свойств микробов (питания, дыхания, роста и размножения) путем посева проб исследуемого материала на питательные среды, выделения чистых культур с последующим изучением их свойств (морфологических, культуральных, биохимических и др.) с целью определения вида микроба.

Биологический метод (биопроба) основан на заражении лабораторных, наиболее чувствительных животных с целью изучения патогенных и токсигенных свойств микробов. В качестве лабораторных животных используют белых мышей, морских свинок, кроликов и др.

Серологический метод основан на обнаружении иммунных тел (антител) в сыворотке крови больных животных с помощью стандартных известных бактериальных антигенов. Изучение антигенных свойств чистой культуры микроорганизмов путем постановки серологических реакций – реакция агглюцинации (РА), реакция преципитации (РП), реакция связывания комплемента (РСК) и др. – проводится с целью определения вида микроорганизмов.

**Устройство микроскопа и правила микроскопии.** При изучении морфологии микроорганизмов используют световые микроскопы Микромед-1.

Световой микроскоп – оптический прибор, предназначенный для изучения микробиологических объектов. В микроскопе имеется механическая и оптическая части.

Механическая часть включает штатив, тубус, столик и систему винтов для передвижения.

Штатив цельнометаллический с прямоугольной ножкой обеспечивает устойчивость микроскопа. С основанием микроскопа соединена коробка, в которой размещен механизм микрометрической фокусировки. К верхней части коробки прикреплен предметный столик, к другой стороне – тубусодержатель. В верхней части имеется револьверное устройство, соединенное с тубусом. Передвижение тубуса осуществляется при помощи винтов. Для грубой наводки служит макрометрический винт, для более точной – микрометрический, полный оборот которого поднимает или опускает тубусодержатель на 0,1 мм.

При вращении рукояток макрометрического и микрометрического винтов по часовой стрелке тубус микроскопа опускается, при вращении против часовой стрелки – поднимается.

Оптическая часть включает объективы, окуляры, осветительное устройство – световой источник, конденсор, диафрагму.

Объективы представляют собой систему линз, закрепленных в металлическую оправу. Все объективы по способу употребления делят на сухие и иммерсионные (погруженные в масло или воду). У сухих объективов между фронтальной линзой и рассматриваемым препаратом находится воздух. Поэтому они дают слабое увеличение (в 8–20 раз).

Иммерсионные объективы позволяют получить увеличение в 40–90 раз из-за наименьшего фокусного расстояния между фронтальной линзой и препаратом. При иммерсионном микроскопировании на препарат наносят каплю иммерсионной жидкости (глицерин, вазелин, кедровое масло и др.) с показателем преломления света 1,48–1,52, близким к показателю преломления стекла.

Окуляры увеличивают изображение объектива от 40 до 1600 крат ( $4\times/0,1$ ;  $10\times/0,25$ ;  $40\times/0,65$ ;  $100\times/1,25$  м).

Конденсор служит для собирания лучей, идущих от светового источника (лампочки) к одной точке – фокусу. Состоит из систем линз. Для яркого освещения при изучении неокрашенных объектов поднимают вверх, для уменьшения освещенности опускают вниз.

Диафрагма находится над конденсором и состоит из металлических пластинок, которые рычажком раздвигаются и сдвигаются для увеличения или уменьшения доступа света. При сужении пластин световых лучей в объектив попадает мало, при открытии – больше.

Разрешающая способность для современных микроскопов находится в пределах 0,2 мкм и зависит от длины световой волны. Общее увеличение микроскопа – это произведение увеличений объектива и окуляра.

### **Правила работы с иммерсионной системой микроскопа.**

*Начало работы:*

1. Установить микроскоп на самое малое увеличение ( $4\times/0,1$ ).
2. Навести максимальную освещенность.
3. Установить исследуемый препарат на предметный столик и закрепить его зажимами.

4. Найти изображение предмета на малом увеличении.
5. Нанести на препарат каплю иммерсионной жидкости.
6. Установить микроскоп на большое увеличение ( $100\times/1,25$ ) до щелчка.
7. Под контролем глаза микровинтом опустить объектив микроскопа максимально вниз, пока он не коснется иммерсионной жидкости.
8. Наблюдая в окуляр, поднимать микровинтом вверх тубус до тех пор, пока не появится изображение предметов.
9. Микровинтом установить более четкое изображение.
10. Провести микроскопию препарата-мазка.

*Конец работы:*

1. Поднять вверх тубус макровинтом.
2. Снять исследуемый препарат.
3. Объектив  $100\times/1,25$  отвести в сторону и чистой салфеткой удалить остатки иммерсионной жидкости.
4. Установить микроскоп на малое увеличение и опустить тубус вниз.
5. Предметный столик покрыть марлевой салфеткой.

#### **Порядок выполнения работы.**

Микроскопировать препараты, приготовленные из чистых культур молочнокислого стрептококка, ацидофильной палочки, дрожжей, под различным увеличением и в иммерсионной системе. Зарисовать микроорганизмы.

#### **Контрольные вопросы**

1. Правила техники безопасности при работе в микролаборатории.
2. Оборудование микробиологической лаборатории.
3. Микробиологические методы исследований.
4. Устройство светового микроскопа.
5. Назначение отдельных частей оптической системы.
6. Правила работы с микроскопом.
7. Правила работы с иммерсионной системой микроскопа.

#### **Тема 2. Микроскопический метод исследования микроорганизмов. Приготовление препаратов-мазков, препаратов «раздавленная капля» и «висячая капля». Простой метод окрашивания**

**Цель занятия:** изучить технику приготовления микроскопических препаратов, выращенных на твердых и жидких питательных средах. Освоить простые методы окрашивания препаратов.

**Материалы и оборудование:** пробы агаровых и бульонных культур микроорганизмов (молочнокислый стрептококк, дрожжи, аммонификаторы и др.); предметные стекла; покровные стекла; стекла с луночками; бактериологические петли; маркеры; стерильное вазелиновое масло; фильтровальная бумага для высушивания препаратов; набор красок (генцианвиолет, метиленовый синий, фуксин Пфейффера); иммерсионное

масло; дистиллированная вода; ванночки с мостиками для окрашивания препаратов; микроскопы; слайды, видеоматериал.

**Задание 1.** Приготовить из микробных культур препараты «висячая капля», «раздавленная капля». Изучить подвижность микроорганизмов под сухой системой микроскопа (4×/0,1).

**Задание 2.** Приготовить препараты-мазки из плотных и жидких бактериальных культур.

**Задание 3.** Окрасить микропрепараты простым методом. Микроскопировать. Микроскопическую картину зарисовать в тетради.

Одним из методов микробиологического исследования является микроскопия, позволяющая определить:

- 1) наличие или отсутствие микроорганизмов;
- 2) форму бактерий и их расположение;
- 3) наличие или отсутствие спор;
- 4) образование капсул;
- 5) подвижность микроорганизмов;
- 6) отношение к окрашиванию по Граму.

Микроскопический метод исследования предусматривает изучение микробов в живом и убитом (окрашенном виде) состоянии.

#### **Порядок выполнения работы.**

*Приготовление препарата «висячая капля».* Препарат готовят на предметном стекле с луночкой (углублением). Края луночки смазывают тонким слоем вазелина. Культуру микроорганизмов наносят на середину необезжиренного покровного стекла. Если микроорганизмы выращены в жидкой среде, то берут каплю такой культуры, если на плотной, то вначале на покровное стекло наносят каплю стерильного физиологического раствора, а затем бактериологической петлей культуру микробов. Предметное стекло переворачивают на 180° и аккуратно накладывают на покровное так, чтобы капля оказалась в центре луночки. Готовый препарат переворачивают в прежнее положение.

В таком препарате капля подвешена с внутренней поверхности покровного стекла и находится в герметически закрытой влажной камере, что позволяет наблюдать за движением микробов длительное время. Препарат рассматривают под микроскопом с плоским зеркалом и суженной диафрагмой. При малом увеличении (4×/0,1) находят край капли, отчетливо видный в затемненном поле зрения. Устанавливают его в центре поля зрения микроскопа. Не сдвигая препарат, переходят на иммерсионную систему, слегка расширив диафрагму.

*Приготовление препарата «раздавленная капля».* Препарат готовят на предметном стекле. Для этого на его поверхность наносят каплю 16–24-часовой микробной культуры и раздавливают ее, наложив покровное стекло. При раздавливании капли нужно избегать образования в ней пузырьков воздуха. Для этого покровное стекло ставят на ребро у края капли, опускают, постепенно вытесняя воздух. Если часть жидкости выступает, ее удаляют фильтровальной бумагой.

Препарат «раздавленная капля», предназначенный для выявления подвижности микроорганизмов, рассматривают под микроскопом с большим увеличением (объектив 10×/0,25 или 40×/0,65 при опущенном конденсоре).

### **Приготовление окрашенных препаратов.**

*Техника приготовления мазка.* Мазок готовят на предметном стекле при помощи бактериологической петли или пастеровской пипетки из культур микробов и т. д.

Стекла, которыми пользуются для этой цели, должны быть чистыми, хорошо обезжиренными, без царапин. Обезжиривают предметные стекла при помощи корковой пробки или сухого мыла с последующим протиранием чистой салфеткой. На хорошо обезжиренном стекле вода не собирается в капельки, а равномерно растекается по поверхности.

Зажигают газовую горелку и работают в радиусе 20–25 см.

Пробирку с культурой аккуратно встряхивают или перемещают вращательными движениями в ладонях, так чтобы не намочить пробку, для равномерного распределения микробов.

Бактериологическую петлю при работе держат в правой руке между большим, указательным и средним пальцами (как ручку при письме).

Пробирку с культурой кладут почти в горизонтальном положении на указательный и средний пальцы повернутой вверх ладонью левой руки и придерживают большим пальцем.

Петлю прокаливают над пламенем горелки до покраснения. Затем мизинцем и безымянными пальцами правой руки вынимают из пробирки ватную пробку и держат ее концом вниз так, чтобы бывшая в пробирке часть пробки не касалась руки.

Слегка обжигают на пламени край пробирки, отводят ее несколько влево и вперед от горелки и вводят бактериологическую петлю. Петлей захватывают капельку культуры бактерий и наносят на предметное стекло. Затем прокаливают петлю и, продолжая держать ее в правой руке, снова обжигают край пробирки над пламенем, закрывают пробирку пробкой и ставят в штатив.

Круговыми движениями петли каплю культуры распределяют по стеклу тонким равномерным слоем. Петлю обеззараживают над пламенем горелки и ставят в штатив.

Если мазок делают из культуры микробов, растущих на плотной питательной среде, то вначале на стекло наносят каплю стерильного физиологического раствора, а затем, захватив петлей немного исследуемого материала, размешивают его в капле и делают мазок. Мазок высушивают на воздухе при комнатной температуре.

Высушенный мазок фиксируют. Тыльной стороной препарата проводят над пламенем горелки 3–4 раза с 5–6-секундными промежутками или погружают в специальные жидкости – фиксаторы:

- 1) в смесь равных объемов спирта и эфира – на 10–15 мин;
- 2) в уксус – на 5 мин;
- 3) в метиловый спирт – на 2–3 мин.

При фиксации происходит обезвреживание микробов и приклеивание их к стеклу. Фиксированный мазок окрашивается легче, так как мертвый белок более восприимчив к окрашиванию.

На предметном стекле с обратной стороны маркером обводят контуры приготовленного мазка (диаметр 1,5–2,0 см) и подписывают.

**Простой метод окрашивания.** При окрашивании простым методом используется один краситель: метиленовый голубой, генцианвиолет, рабочий раствор фуксина. Простой метод окрашивания представляет собой физико-химический процесс, при котором происходит поглощение красителя микробной клеткой.

*Техника окрашивания.* На фиксированный препарат-мазок наносят несколько капель красителя. Метиленовой синью окрашивают в течение 2–3 мин, генцианвиолетом – 1–2 мин, водным раствором фуксина Пфейффера – 1–2 мин. Мазок хорошо промывают водой и высушивают фильтровальной бумагой.

Препарат рассматривают под иммерсионной системой микроскопа. Микроскопическую картину зарисовывают в тетради.

### **Контрольные вопросы**

1. Техника приготовления микроскопических препаратов для определения подвижности микроорганизмов.
2. Техника приготовления препаратов-мазков из культур микробов на плотной и жидкой средах.
3. Назначение и способы фиксации мазков.
4. Назначение и способы простого метода окрашивания.

### **Тема 3. Морфология микроорганизмов разных видов. Их особенности. Морфология грибов**

**Цель занятия:** изучить морфологию бактерий, их формы, виды скоплений. Изучить морфологию и строение грибов.

**Материалы и оборудование:** пробы агаровых и бульонных культур микроорганизмов (молочнокислый стрептококк, дрожжи, аммонификаторы и др.); предметные стекла; покровные стекла; стекла с луночками; бактериологические петли; маркеры; стерильное вазелиновое масло; фильтровальная бумага для высушивания препаратов; набор красок (генцианвиолет, метиленовый синий, фуксин Пфейффера, люголь); иммерсионное масло; дистиллированная вода; ванночки с мостиками для окрашивания препаратов; микроскопы, демонстрационные слайды, видеоматериал.

**Задание 1.** Приготовить из разных микробных культур препараты для изучения форм и видов скопления бактериальных клеток.

**Задание 2.** Приготовить препараты из разных культур для изучения морфологии плесневых грибов.

**Задание 3.** Ознакомиться с морфологией дрожжевых клеток.

**Морфология бактерий.** Бактерии имеют четкую форму клетки, но она не является абсолютно постоянной, так же, как и их размеры. Морфологические изменения наблюдаются у многих микроорганизмов под влиянием различных факторов окружающей среды. Как правило, такие изменения носят непостоянный, ненаследственный характер и называются модификационными (от англ. *modify* – видоизменять).

В природе бактерии встречаются в самых разнообразных формах. По внешнему виду они делятся на четыре основные группы: **палочковидные**, **шаровидные** (кокки), **извитые** (вибрионы, спириллы, спирохеты), **нитевидные** (хламидобактерии). В некоторых средах встречаются даже треугольные формы микроорганизмов.

**Палочковидные** формы микроорганизмов (рис. 1) подразделяются на собственно **бактерии** (от греч. *bakterion* – палочка), **бациллы** и **кlostридии**. К бактериям относятся палочковидные микроорганизмы, не образующие спор. К бациллам (от лат. *bacillum* – палочка) и кlostридиям (от греч. *closter* – веретено) принадлежат микробы, образующие споры.

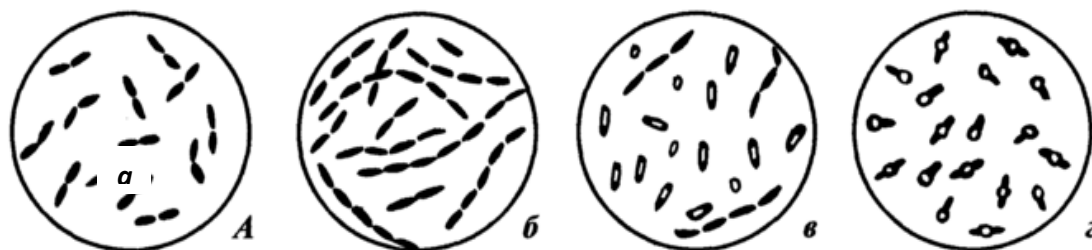


Рис. 1. Палочковидные формы микроорганизмов: *a* – диплобактерии; *б* – стрептобактерии; *в* – бациллы; *г* – кlostридии

Бактерии бывают **короткими** (кишечная палочка), **длинными** (сибиреязвенная палочка), с **закругленными** и **заостренными** концами (фузобактерии).

По взаимному расположению палочковидные формы бактерий распределяются на три подгруппы: **диплобактерии** и **диплобациллы**, располагающиеся попарно, по длине; **стрептобактерии** и **стрептобациллы**, располагающиеся цепочкой; бактерии, располагающиеся **без определенной системы**.

Шаровидные бактерии – **кокки** (от греч. *coccus* – шар) бывают сферические, эллипсоидные, бобовидные и ланцетовидные. По расположению, характеру деления и биологическим свойствам кокки подразделяют на **микрочкокки**, **диплококки**, **стрептококки**, **тетракокки**, **сарцины**, **стафилококки** (рис. 2).

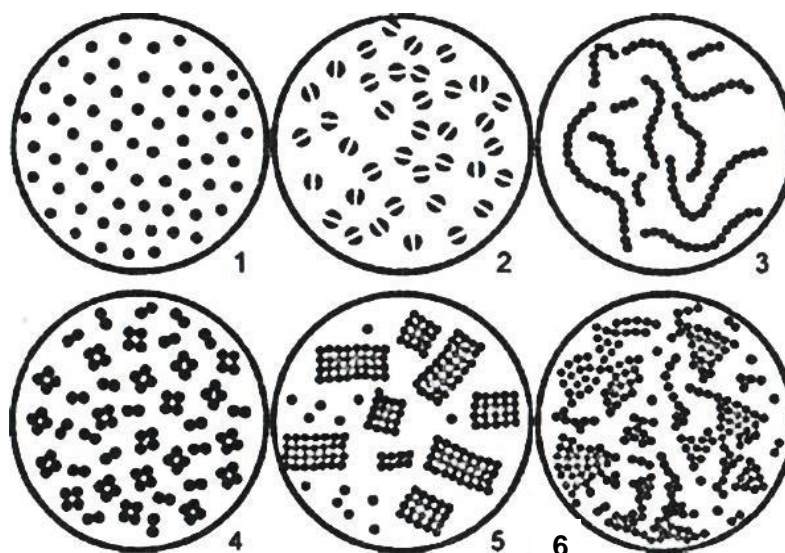


Рис. 2. Шаровидные бактерии – кокки:  
 1 – микрококки; 2 – диплококки; 3 – стрептококки; 4 – тетракокки;  
 5 – сарцины; 6 – стафилококки

**Микрококки** (от греч. *micros* – малый) характеризуются одиночным, парным или беспорядочным расположением клеток. Они являются сапрофитами, обитателями воды и воздуха.

**Диплококки** (от греч. *diplos* – двойной) делятся в одной плоскости и образуют парные кокки, соединенные по две особи. К диплококкам относятся менингококки, гонококки, а также *Azotobacter chroococcum*.

**Стрептококки** (от греч. *streptos* – цепь) делятся всегда в одном направлении и образуют цепочки различной длины.

**Тетракокки** (от греч. *tetra* – четыре) располагаются по четыре и делятся в двух взаимно перпендикулярных плоскостях.

**Сарцины** (от греч. *sarcio* – связываю) – кокковые формы микроорганизмов, которые делятся в трех взаимно перпендикулярных плоскостях и выглядят в виде тюков по 8, 16, 18 и более клеток.

**Стафилококки** (от греч. *staphyle* – гроздь) – гроздевидно расположенные кокки. Благодаря делению клеток в различных направлениях они принимают форму виноградной грозди.

Среди извитых форм бактерий различают **вибрионы**, **спириллы** и **спирохеты** (рис. 3). Вибрионы имеют форму запятой или полумесяца. Типичными представителями вибрионов являются холерный вибрион (*Vibrio cholerae*) и непатогенные вибрионы – обитатели многих водоемов. **Спириллы** (от лат. *spira* – изгиб) представляют собой бактерии извитой формы, имеющие несколько завитков, равных одному или нескольким оборотам спирали, что придает им штопорообразный вид. **Спирохеты** (от лат. *spira* – изгиб, греч. *chaite* – хохол, грива) имеют вид длинных и тонких клеток с большим количеством спиральных завитков вокруг осевой нити. При этом длина клеток превышает ширину в 5–200 раз.

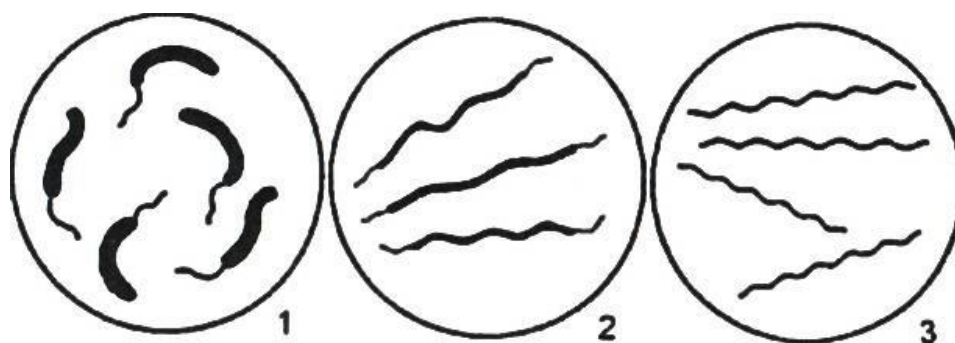


Рис. 3. Извитые формы бактерий:  
1 – вибрионы; 2 – спириллы; 3 – спирохеты

Кроме этих наиболее распространенных в природе форм бактерий в почве и водоемах обнаружены новые формы бактерий: тороиды, простеки, нитчатые бактерии (рис. 4).

**Тороиды** имеют вид разомкнутого или замкнутого кольца.

**Простеки** имеют форму шестиугольной звезды, розетки, клетки с выростами.

**Нитевидные** бактерии (серобактерии, железобактерии) обитают в основном в водоемах. Нити их имеют толщину в среднем от 1 до 7 мкм. Среди них нет представителей патогенных для рыб, человека и животных.

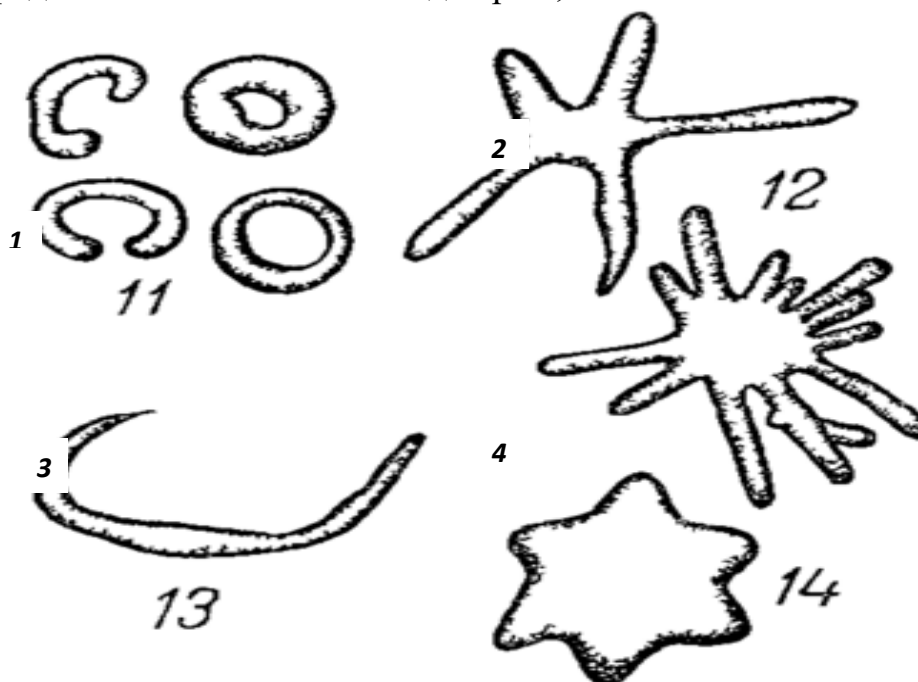


Рис. 4. Новые формы бактерий: 1 – тороиды; 2 – бактерии, образующие простеки; 3 – бактерии червеобразной формы; 4 – бактерии в форме шестиугольной звезды

Форма бактерий влияет на их жизнестойкость. Так, например, кокки, благодаря своей округлой форме, меньше деформируются при высушивании, чем палочки. Вследствие этого кокки выдерживают более длительное воздействие химических и дезинфицирующих средств. У палочек больше соотношение поверхности к объему, чем у кокков, поэтому они быстрее аккумулируют питательные вещества, а также различные

антимикробные вещества.

Микробы обладают полиморфизмом, при котором наблюдается разнообразие их форм, проявляющееся независимо от возраста и стадии развития. Они чрезвычайно пластичны и легко подвергаются изменениям под влиянием различных факторов: температуры, питательной среды, концентрации солей, кислотности, дезинфицирующих веществ, лекарственных препаратов и т. д.

Особенно часто полиморфизм у бактерий проявляется при культивировании на искусственных средах. В результате ответных реакций бактерий на физические и химические свойства питательной среды появляются измененные по форме и величине клетки: сильно увеличенные, раздутые, колбовидные, нитевидные и т. п.

**Строение бактериальной клетки.** Основной физической единицей всего живого является клетка. Энергетические реакции, природа генетического материала, аппарат его репликации и механизм биосинтеза белка во всех клетках в основном одинаковы. Но прокариотическая бактериальная клетка обладает рядом характерных особенностей, которые отличают ее от эукариотической клетки. Среди этих особенностей следует отметить тип рибосом, морфологическую организацию ядра и аппарата дыхания (у бактерий нет митохондрий), отсутствие эндоплазматической сети, неспособность бактерий синтезировать стерины и наличие особых гетеро-полимеров, входящих в состав клеточной стенки.

У эукариотов имеется истинное ядро, отделенное от цитоплазмы ядерной мембраной. В ядре содержится набор хромосом, который после удвоения в процессе митоза передается двум дочерним клеткам. Цитоплазма эукариотической клетки содержит митохондрии и пластиды. Цитоплазматическая мембрана переходит внутри клетки в эндоплазматическую сеть и в ядерную мембрану. Прокариоты представляют собой в основном одноклеточные, но также нитчатые, мицелиальные и колониальные организмы, лишённые хлорофилла и обитающие во влажных средах.

Прокариоты являются реликтовыми формами живых организмов, сохранившихся с древнейших времен. Основным отличительным признаком прокариотов является отсутствие ядра, окруженного мембраной. Вместо ядра у бактерий имеется образование, получившее название «нуклеоид». Нуклеоид бактерий состоит из нуклеопротеидов, основным компонентом которых является ДНК. Он не ограничен от цитоплазмы какой-либо ядерной мембраной и не связан с основным протеином бактериальной клетки.

К числу основных компонентов бактериальной клетки относятся: клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, цитоплазма и нуклеоид (рис. 5).

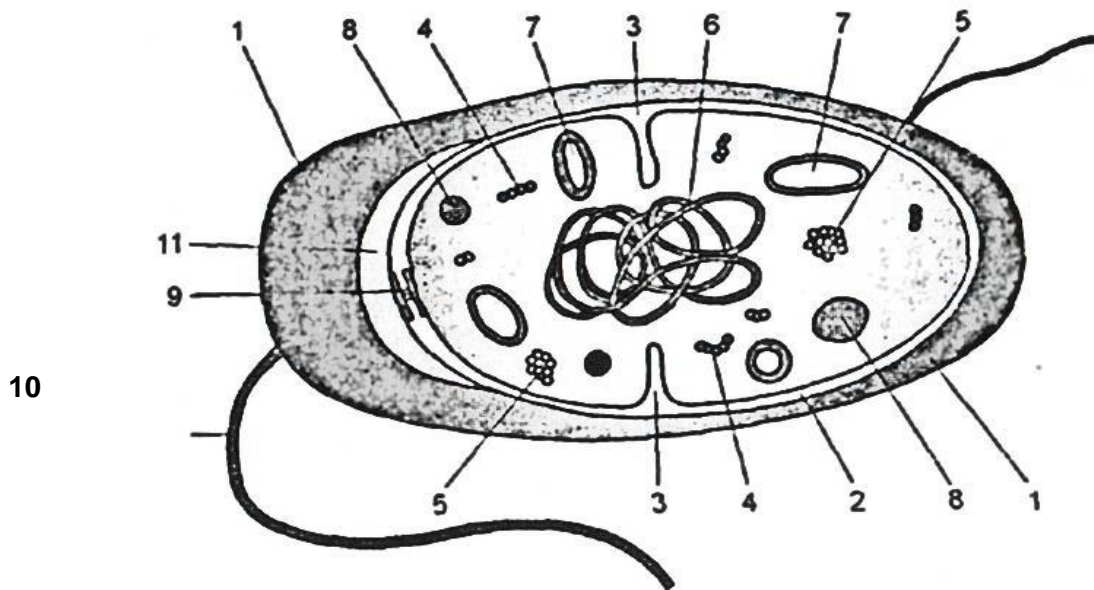


Рис. 5. Строение микробной клетки:

1 – клеточная стенка; 2 – цитоплазматическая мембрана; 3 – мезосомы;  
 4 – рибосомы; 5 – полисомы; 6 – клубок кольцевой хромосомы, состоящей  
 из молекулы ДНК (нуклеоид); 7 – плазида; 8 – запасные вещества и внутриклеточные  
 включения; 9 – диски базального тела жгутика; 10 – жгутик; 11 – периплазма

В зависимости от строения клеточной стенки прокариоты делят на две группы: грамположительные и грамотрицательные. Установлено, что грамположительные бактерии после окрашивания основными красителями трифенилметанового ряда (кристаллвиолетом или генцианвиолетом) и обработки йодом утрачивают способность обесцвечиваться спиртом. Аналогичная окраска грамотрицательных бактерий не приводит к образованию прочного окрашенного комплекса, вследствие чего они легко обесцвечиваются спиртом или ацетоном.

Клеточные стенки *грамположительных* и *грамотрицательных* бактерий различаются по своему химическому составу и ультраструктуре. У грамположительных микроорганизмов имеется несколько пептидогликановых слоев, на которые приходится от 50 до 90 % массы клеточной стенки. У грамотрицательных бактерий содержание пептидогликана в клеточной стенке колеблется от 1 до 10 %.

Клеточная стенка грамположительных бактерий устроена менее сложно и выглядит как гомогенный толстый пептидогликановый слой. У грамотрицательных бактерий клеточная стенка состоит из липополисахарида, наружной мембраны и липопротеина, которые трехконтурным слоем расположены над пептидогликаном. Липопротеин связывает пептидогликан с наружной мембраной, а липополисахарид крепится к наружной мембране с помощью гидрофобных связей (рис. 6). Такой комплекс создает дополнительный барьер на пути проникновения в клетку различных веществ. Поэтому грамотрицательные бактерии более устойчивы к воздействию различных химических, в том числе и дезинфицирующих, веществ.

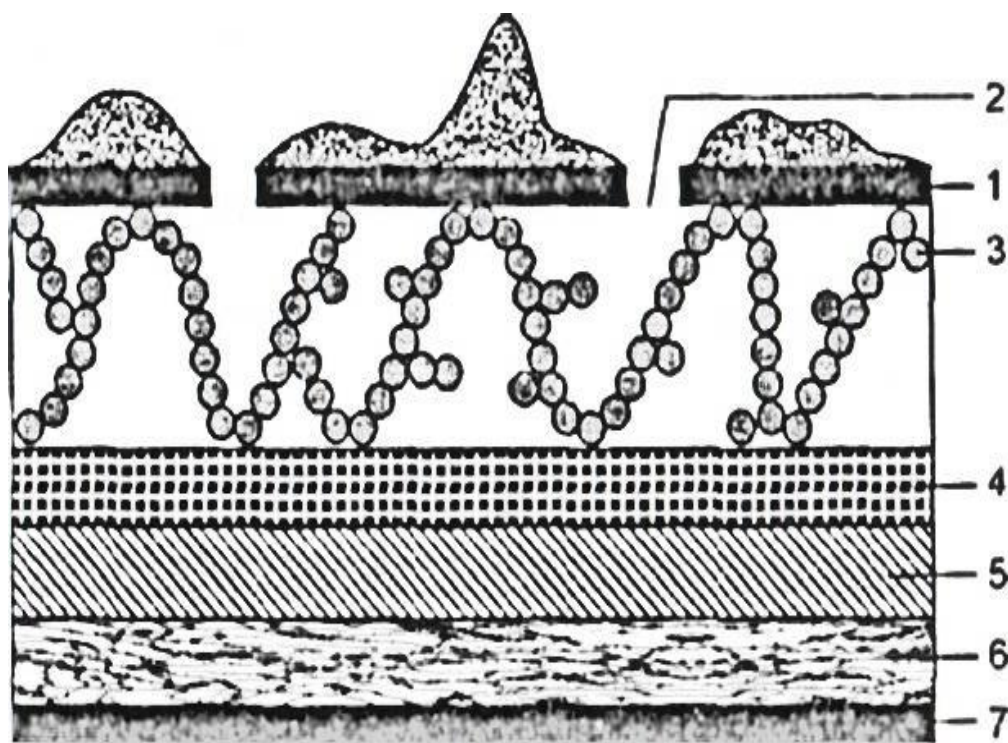


Рис. 6. Схематическое строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий:  
 1 – липополисахаридный слой с липопротеидными бугорками; 2 – каналы липополисахаридного слоя; 3 – молекулы белка (гидрофобные связи);  
 4 – наружная мембрана; 5 – липопротейн; 6 – пептидогликан;  
 7 – цитоплазматическая мембрана

Движение бактерий – одно из самых поразительных явлений природы, которое впервые наблюдал А. Левенгук. Современные исследования показали, что бактерии используют для своего движения устройство более сложное, чем колесо, а именно ротор, вращающийся под действием электрического поля.

Благодаря такому электродвигателю многие виды бактерий способны плыть сквозь толщу воды со скоростью до 150 мкм в секунду, т. е. за 1 с бактерия покрывает расстояние, примерно в 100 раз превышающее ее длину.

Основным двигательным органоидом бактерий служат жгутики (флагеллы). Жгутики представляют собой специальные нитевидные образования.

У некоторых бактерий есть всего один жгутик, у других – их может быть до нескольких десятков. Расположение жгутиков у подвижных бактерий – характерный признак, который имеет таксономическое значение. В зависимости от расположения жгутиков микробы подразделяются на четыре группы (рис. 7):

1) **монотрихи** – бактерии с одним жгутиком на конце (холерный вибрион, синегнойная палочка);

2) **лофотрихи** – бактерии, которые имеют по пучку жгутиков на одном конце;

3) **амфитрихи** – бактерии с двумя полярно расположенными жгутиками или имеющие по пучку жгутиков на обоих концах;

4) **перитрихи** – бактерии, обладающие жгутиками по всей поверхности тела (кишечная палочка, сальмонеллы).

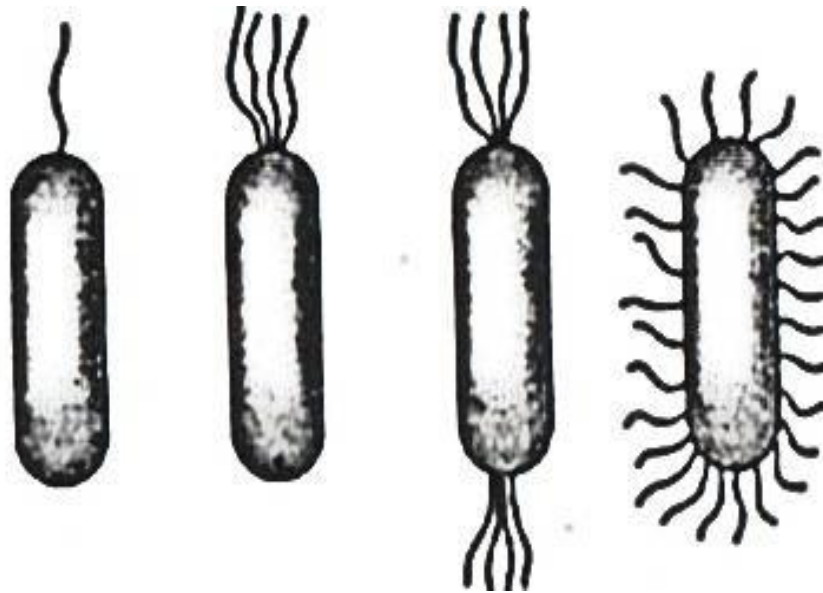


Рис. 7. Разновидности жгутиковых бактерий:  
1 – монотрихи; 2 – лофотрихи; 3 – амфитрихи; 4 – перитрихи

Подвижные бактерии способны к направленным движениям, или таксисам. В зависимости от факторов среды, под влиянием которых происходит движение, различают хемотаксис, аэротаксис и фототаксис. При хемотаксисе бактерии уходят из зоны высокой или низкой концентрации веществ в места более благоприятного обитания. Аэротаксис определяется отношением бактерий к кислороду, а фототаксис – отношением бактерий к солнечному свету как источнику энергии.

**Морфология и строение актиномицетов.** Актиномицеты, или лучистые грибы (от греч. *actis* – луч, *mycos* – гриб), представляют собой особые группы грамположительных микроорганизмов с морфологическими особенностями бактерий и низших растительных организмов, широко распространенных в природе. Они в огромном количестве обитают в почвах, богатых органическими веществами, на скальных породах, участвуют в круговороте веществ в природе. Реже актиномицеты обитают в пресных водоемах.

Актиномицеты часто обнаруживаются в теле человека и животных, на слизистых оболочках рта, в налете зубов. Хотя большинство из них не патогенны для человека и животных, в четырех семействах есть формы, способные вызывать заболевания. Некоторые виды актиномицетов патогенны для растений, другие являются клубеньковыми азотфиксирующими симбионтами.

Большинство актиномицетов – мезофилы, но среди них часто встречаются и термофилы. Почти все актиномицеты – аэробы. Многие из них образуют пигменты разного цвета и химической природы. Актиномицеты обладают большим и разнообразным набором ферментов. Они синтезируют различные, в том числе и биологически активные, вещества и в больших количествах выделяют их в окружающую среду. Среди этих веществ есть витамины, аминокислоты, фитогормоны, каротиноиды, токсины. Многие актиномицеты имеют промышленное значение для получения антибиотиков, таких, как

стрептомицин, тетрациклин, нистатин, левомицетин, олеандомицин, эритромицин. Некоторые актиномицеты продуцируют особые вещества (актиномицины), подавляющие иммуногенез и рост некоторых раковых клеток.

Актиномицеты обладают некоторыми признаками, общими как с бактериями, так и с грибами. Как и бактерии, они состоят из одной клетки, содержат в составе клеточной стенки пептидоглюкан, не имеют дифференцированного ядра. В то же время многие виды актиномицетов по строению напоминают мицелиальные грибы. Они имеют хорошо развитый, видимый глазом мицелий, который представляет собой тонкую длинную ветвящуюся нить, напоминающую гифы грибов, диаметром 0,2–1,0 мкм, иногда значительной длины.

**Морфология и строение плесневых грибов.** К плесневым грибам относят микроорганизмы, имеющие одноклеточный или многоклеточный мицелий, дифференцированные органы плодоношения, содержащие экзо- или эндоспоры. Они являются растительными гетеротрофными, хемоорганотрофными, аэробными организмами, лишенными хлорофилл. С растениями их связывает наличие клеточной стенки и вакуолей, заполненных клеточным соком, ток протоплазмы, отсутствие способности к движению. Однако по сравнению с растениями они слабо дифференцированы.

Вегетативное тело (мицелий) гриба состоит из длинных, разветвленных нитей, или гифов, наполненных цитоплазмой. У ряда грибов мицелий образован гифами без поперечных перегородок (несептированный мицелий). Большинство грибов имеет гифы с поперечными перегородками, разделяющими их на участки (септированный мицелий).

Клеточная стенка большинства плесневых грибов содержит хитин или близкие к нему соединения. Под клеточной стенкой находится цитоплазма зернистой структуры в виде гранул рибосом. В цитоплазме грибов присутствуют митохондрии, в которых локализируются дыхательные ферменты, а также жировые включения и зерна волютина.

Клетки грибов обладают дифференцированным ядром, окруженным мембраной. Несептированный мицелий содержит несколько ядер.

Грибы размножаются, как правило, бесполом или половым способом. Способ размножения дает возможность определить систематическое положение того или иного гриба.

Бесполое размножение происходит обычно при помощи спор, а также путем почкования или фрагментации. Наиболее широко у грибов распространено спорообразование. Споры грибов (конидиоспоры) отшнуровываются от конидиеносцев или образуются внутри спорангиев (спорангиоспоры). У низших грибов спорангиоспоры часто движутся с помощью жгутиков. Движущиеся спорангиоспоры – *зооспоры*.

Для дрожжей характерным видом бесполого размножения является почкование. При этом на материнской клетке образуется почка, в которую переходит одно ядро, после чего почка отшнуровывается.

Половое размножение у грибов напоминает размножение эукариотических

клеток и включает слияние двух ядер.

Классификация грибов основана главным образом на способах размножения. Грибы подразделяют на пять классов, в которые входят низшие и высшие грибы. Низшие грибы (архимидеты и фикомицеты) объединены в два класса, а высшие (аскомицеты, базидиомицеты и несовершенные грибы) – в три класса.

**Архимидеты** – наиболее примитивные грибы. У одних видов имеется зачаточный мицелий, представляющий собой вегетативное тело, состоящее из разветвленных переплетающихся нитей, называемых гифами. Тело других состоит из голого комочка цитоплазмы, который, превращаясь в спорангий со спорами, покрывается оболочкой. Большинство видов этого класса является внутриклеточными паразитами низших и высших растений. Некоторые из них поражают капустную рассаду (черная ножка), клубни картофеля (рак).

Фикомицеты – грибы с одноклеточным несептированным, многоядерным и сильно разветвленным мицелием, который образует на питательной среде характерный войлочный налет. Размножаются фикомицеты половым и бесполом путем. Бесполое размножение осуществляется эндоспорами, заключенными в особых спорангиях. Половое размножение происходит в результате конъюгации двух половых клеток – гамет.

В класс фикомицетов входит род мукоспоровой (Mucor), или головчатой, плесени (рис. 8). Тело ее состоит из нерасчлененного мицелия в виде сильно разветвленной клетки, от которой ответвляются плодоносящие воздушные гифы – спорангиеносцы с шарообразным расширением наверху – спорангиями. Спорангии заполняются эндоспорами, несущими функцию размножения. При недостатке питательных веществ мукоровая плесень может размножаться и половым путем. Она широко распространена в природе, часто обнаруживается на овощах, на влажных поверхностях, в навозе.

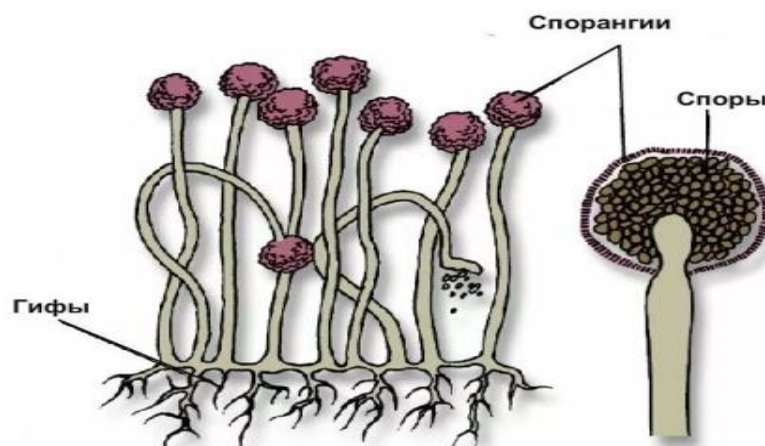


Рис. 8. Мукор

**Аскомицеты**, или сумчатые грибы, представляют собой самый обширный класс грибов. Они характеризуются сильно разветвленным многоклеточным мицелием. Размножение у них обычно бесполое и осуществляется при помощи конидий (экзоспор). При половом процессе они размножаются аскоспорами, развивающимися после слияния ядер половых клеток (гамет) в особых сумках

– асках.

К классу аскомицетов принадлежат **мицелиальные грибы**. Из них чаще всего встречаются различные виды плесневых грибов аспергиллус (*Aspergillus*) и пенициллиум (*Penicillium*). Воздушные гифы этих грибов (рис. 9) заканчиваются наверху утолщением, имеющим особые выросты – **стеригмы**. На концах стеригм образуются экзогенные вегетативные споры – конидии.

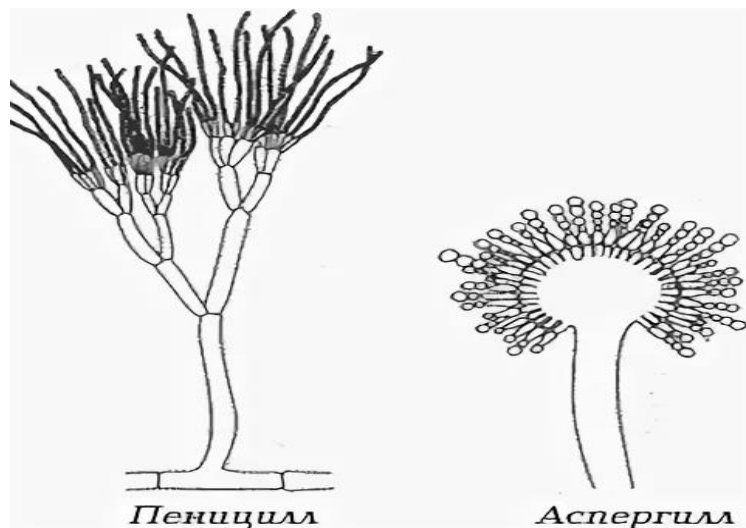


Рис. 9. Плесневые грибы

Аспергиллы имеют многоклеточный мицелий и одноклеточный конидиеносец. На верхнем конце конидиеносца веерообразно расположен ряд коротких стеригм, от которых цепочками отшнуровываются конидии (рис. 10).

При микроскопическом исследовании плодоносящая часть аспергиллов напоминает собой струйки воды, выливаемой из лейки. Это определило название – леечная плесень.

Мицелий у пенициллов и аспергиллов не окрашен, а конидии могут окрашиваться в различные цвета, чаще всего в черный, сине-зеленый или серо-зеленый.

Аспергиллы и пенициллы широко распространены в природе. Типичным представителем аспергиллов является *Aspergillus niger*, который встречается на влажных предметах, в хлебе, варенье.

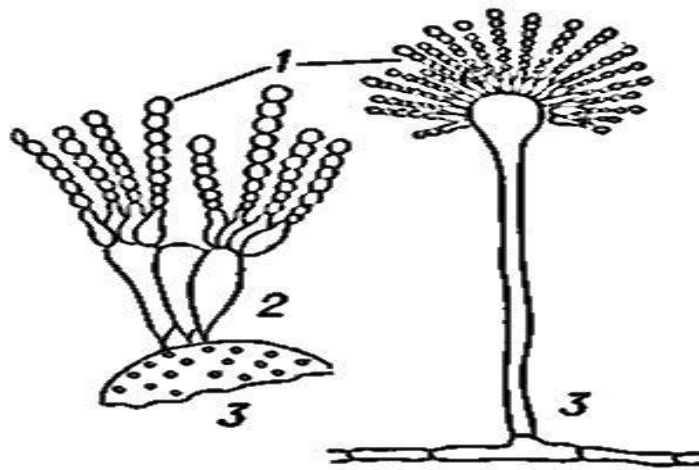


Рис. 10. Аспергилл: 1 – конидии (экзоспоры); 2 – стеригмы; 3 – пузырь (вздутие конидиеносца)

Отдельные виды аспергиллов могут вызывать у человека аспергиллез дыхательных путей, глаз, уха и общее поражение организма. Мицелий и конидиеносец пенициллов – многоклеточные; плодоносящее тело имеет вид кисточки. В верхней части конидиеносец двукратно кистевидно разветвлен. На концах его образуются стеригмы (метулы и фиалиды), от которых отшнуровываются четкообразные ряды конидий (рис. 11).

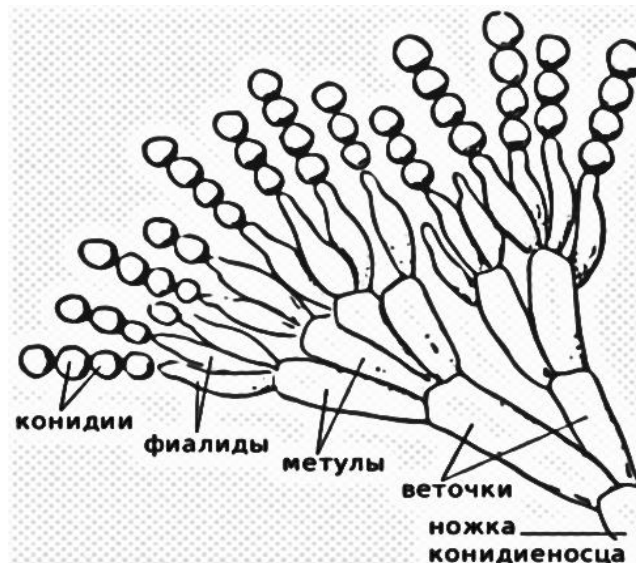


Рис. 11. Трехъярусная кисточка пеницилла

Пенициллы обнаруживаются в кормах, молочных продуктах, на влажных предметах, в варенье. Некоторые виды этого гриба являются патогенными для человека. Они вызывают поражения кожи, ногтей, уха, верхних дыхательных путей, легких и других органов.

К классу *Ascomycetes* порядку *Plectascales* (первично сумчатые грибы) принадлежат **дрожжи**, которые представляют собой крупные одноклеточные неподвижные микроорганизмы (рис. 12).

Они образуют клетки овальной, шаровидной и палочковидной формы, имеют двуконтурную оболочку, митохондрии и хорошо дифференцированное ядро. Цитоплазма их гомогенна, иногда тонкозернистого строения, имеет включения (гликоген, волютин, жир) и вакуоли, а также нитчатые тельца – хондриосомы, которые принимают участие в синтетических процессах, протекающих в клетке. Дрожжи размножаются почкованием, делением, спорообразованием, а некоторые виды дрожжей – половым путем. При почковании от материнской клетки отделяются дочерние клетки, превращающиеся в самостоятельные особи. Отделение выростов-почек от материнских клеток может происходить в любой стадии развития.

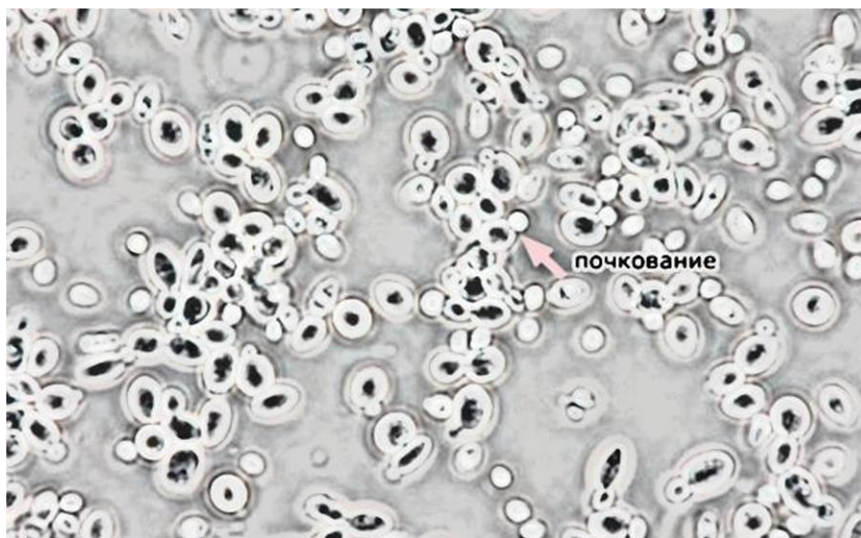


Рис. 12. Дрожжи

Дрожжи могут размножаться и спорообразованием. Споры образуются внутри клеток, оболочка которых выполняет роль сумки (аскуса). Это позволило отнести дрожжи к сумчатым грибам – аскомицетам. Споры у дрожжей округлой формы и покрыты гладкой оболочкой. В одном аскусе количество спор может достигать 2, 4, 6, 8, реже 12.

Многие виды и разновидности дрожжей обладают способностью сбраживать различные углеводы. Поэтому они широко используются в пивоваренной и винодельческой промышленности, хлебопечении.

К аспорогенным дрожжам относятся патогенные для человека виды из рода *Candida*, которые вызывают тяжелые заболевания – кандидозы. Они возникают вследствие подавления нормальной микрофлоры антибиотиками, применяемыми для лечения ряда инфекционных заболеваний и воспалительных процессов, а также при тяжелых заболеваниях, когда происходит снижение защитных сил организма.

**Базидиомицеты** – грибы с многоклеточным мицелием (рис. 13). Они имеют дифференцированное ядро и размножаются преимущественно половым путем с помощью базидиоспор, которые развиваются в специальных органах размножения – базидиях. Базидии содержат определенное количество спор, обычно четыре. Большинство базидиомицетов являются сапрофитами и живут на перегнойной почве, на растительных остатках, активно участвуя в разложении органических соединений. Отдельные виды являются паразитами

сельскохозяйственных растений, поражают древесину.

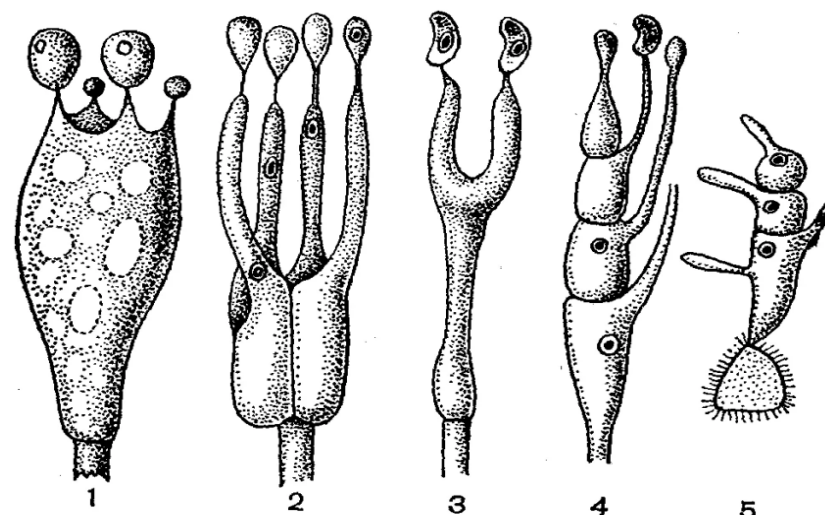


Рис. 13. Базидиомицеты:

1 – холобазидия; 2, 3, 4 – гетеробазидии; 5 – склеробазидия

**Несовершенные грибы** – очень большая группа грибов, обладающих многоклеточным мицелием, но не имеющих ни сумчатого, ни базидиального спороношения, а лишь имеющих конидии. Размножаются исключительно бесполом путем при помощи конидий. К этому классу грибов относится порядок *Hyphomycetales*.

Среди гифомицетов имеются возбудители фузариотоксикоза («пьяный хлеб») и интоксикаций у человека и животных.

Грибы принимают активное участие в процессах трансформации основных биогенных соединений и играют огромную роль в процессах почвообразования. Они начинают процессы разрушения наиболее стойких органических соединений углерода, таких, как лигнин, хитин, гумус, клетчатка. В процессе жизнедеятельности грибы выделяют ферменты, органические кислоты, витамины, антибиотики и другие биологически активные вещества, влияющие на развитие микроорганизмов и высших растений.

Грибы обладают большой устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды и могут активно размножаться в кислой и щелочной среде, в условиях высокой концентрации солей и недостатка влаги.

### Контрольные вопросы

1. Основные формы микроорганизмов.
2. Характеристика шаровидных форм микроорганизмов.
3. Палочковидные формы бактерий.
4. Особенности извитых форм микроорганизмов.
5. Микроскопические грибы: классификация, значение, распространение.
6. Морфология и строение плесневых грибов.
7. Морфология и строение дрожжей.

### Тема 4. Сложные методы окрашивания препаратов

**Цель занятия:** освоить технику окрашивания микроорганизмов сложными методами. Научиться отличать грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы.

**Материалы и оборудование:** образцы культуры микроорганизмов (сенная бацилла, молочнокислый стрептококк, ацидофильная палочка, дрожжи); наборы красок и реактивов для окрашивания микроорганизмов сложными методами; бактериологические петли; предметные стекла; горелки; маркеры; микроскопы; слайды, видеоматериал.

**Задание 1.** Приготовить препараты-мазки из образцов культур микробов. Окрасить сложным методом по Граму.

**Задание 2.** Ознакомиться с методикой отличия и особенностями окраски грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Зарисовать микроскопическую картину в тетради.

**Сложные методы окрашивания микроорганизмов.** Химический состав и строение клеточной стенки микробов различны, и поэтому они окрашиваются одними и теми же красителями по-разному и неодинаково реагируют при последующем обесцвечивании этиловым спиртом, кислотами и другими реактивами. Части микробной клетки избирательно реагируют на воздействие красящих растворов. На этом свойстве основаны сложные (дифференциальные) методы окрашивания микробов. Для сложного окрашивания применяют несколько красителей.

В лабораторной практике из сложных методов окрашивания используют метод по Граму, Циля – Нильсона, Козловского и др.

**Сущность метода окрашивания по Граму.** По Граму хорошо окрашиваются молодые формы клеток. Окрашивание по Граму зависит от химического состава клеточной стенки, цитоплазмы и pH среды. Поэтому все микроорганизмы дифференцируют на грамположительные и грамотрицательные.

У грамположительных микроорганизмов содержится РНК в 7–8 раз больше, чем ДНК, до 50 % (по массе) тейхоевых кислот, цитоплазма имеет кислую реакцию среды (pH 2–3). В клеточной стенке много (до 80 % от сухой массы клетки) пептидогликана, поры которого при обработке этиловым спиртом сужаются и препятствуют выходу комплекса, образуемого при взаимодействии красителя генцианового фиолетового с компонентами клетки в присутствии йода. В поверхностном слое клетки находится магниевая соль рибонуклеиновой кислоты, которая в присутствии йода в кислой среде образует прочное соединение с основными красителями (генциановым фиолетовым, метиловым фиолетовым). Поэтому грамположительные микробы прочно удерживают краситель и окрашены в фиолетовый цвет. К грамположительным относятся капустаная бацилла, дрожжи, молочнокислые бактерии, почти все виды патогенных кокков, возбудитель сибирской язвы и т. д.

У грамотрицательных микроорганизмов в состав многослойной клеточной стенки входят ароматические, серосодержащие и другие аминокислоты, цитоплазма имеет менее кислую реакцию (рН 5) и одинаковое количество РНК и ДНК. Отсутствует магниевая соль рибонуклеиновой кислоты. Не образуется прочного соединения основных красителей, они легко обесцвечиваются этиловым спиртом и смываются. Поэтому клетки бактерий окрашиваются в красный цвет. К грамотрицательным микроорганизмам относятся уксуснокислая бактерия, кишечная палочка, палочка сапа, бруцеллы и др.

**Особенности окрашивания спор.** Перед окрашиванием сложным методом изменяют порозность оболочки спор путем воздействия на нее протравителями (хромовой, соляной кислотами) или раствором фенола при подогревании. Оболочка при этом размягчается и увеличивается порозность. Краситель хорошо адсорбируется, споры не обесцвечиваются при кратковременном воздействии кислотой. Вегетативные же тела микробных клеток при действии кислотой обесцвечиваются и становятся видимыми только при дополнительном окрашивании контрастным красителем. Споры окрашивают по методу Златогорова, Пешкова.

**Окрашивание капсул.** Некоторые микробы способны образовывать капсулу – слизистый слой оболочки, который синтезируется в цитоплазме. Размеры капсулы превышают размеры тела микробной клетки. Капсула и другая часть клетки окрашиваются неодинаково. Существует несколько методов окрашивания капсул бактерий (метод Ольта, Михина и др.).

**Особенности окрашивания включений клетки.** В цитоплазме микробных клеток часто содержится гликоген – животный крахмал. При соединении с раствором Люголя гликоген приобретает красно-бурую окраску. Такое включение встречается у дрожжей, сенной бациллы и т. д.

Гранулеза содержится в клетках перед спорообразованием. Реагирует на раствор Люголя – окрашивается в темно-синий цвет. Большое количество гранулезы содержат маслянокислые бациллы. Для обнаружения гранулезы к капле культуры масляных микробов добавляют каплю раствора Люголя и накрывают покровным стеклом. Под иммерсионной системой микроскопа видны веретенообразные клетки, окрашенные в синий цвет. На одном конце этих клеток расположены неокрашенные споры.

**Порядок выполнения работы.**

**Техника окрашивания микроорганизмов.**

**Техника окрашивания по Граму.**

1. На фиксированный мазок кладут заранее окрашенную генцианвиолетом фильтровальную бумагу (модификация по Синеву), смачивают дистиллированной водой. Выдерживают в течение 2 мин.
2. Бумагу удаляют и на мазок наливают раствор Люголя на 2 мин.
3. Раствор Люголя сливают и наносят на мазок 96%-ный спирт на 20 с.
4. Препарат промывают водой.
5. Дополнительно окрашивают фуксином Пфейффера в течение 2 мин.

6. Промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют.

Микроскопическая картина следующая: грамположительные микроорганизмы окрашиваются в фиолетовый цвет, а грамотрицательные – в красный.

#### **Техника окрашивания спор.**

##### ***Метод окраски по Меллеру.***

1. На мазок наливают 5%-ный водный раствор хромовой кислоты на 3–4 мин, промывают водой, просушивают фильтровальной бумагой.

2. На мазок кладут полоску чистой фильтровальной бумаги и сверху наливают раствор карболового фуксина, подогревают препарат снизу пламенем горелки до появления паров, красят в течение 10 мин.

3. Не промывая водой, краску с бумагой сливают и обесцвечивают 5%-ным раствором серной кислоты в течение 5–6 с.

4. Промывают дистиллированной водой.

5. Дополнительно окрашивают раствором метиленовой синьки 4 мин.

6. Промывают водой, просушивают и микроскопируют.

Микроскопическая картина следующая: споры красного цвета, вегетативные клетки синего цвета.

##### ***Метод Пешкова.***

1. На фиксированный препарат наливают раствор щелочной метиленовой синьки. Доводят ее до кипения и, держа препарат над пламенем горелки, кипятят 15–20 с.

2. Смывают синьку водой.

3. Дополнительно окрашивают 0,5%-ным водным раствором нейтрального красного в течение 30 с.

4. Промывают дистиллированной водой, высушивают в промокательном блокноте и микроскопируют.

Микроскопическая картина следующая: споры голубые или синие, протоплазма вегетативных форм розовая.

#### **Техника окрашивания капсулообразующих микробов.**

##### ***Метод окраски по Михину.***

1. Фиксированный препарат окрашивают в течение 6–7 мин раствором метиленовой синьки с легким подогреванием над пламенем до появления пара.

2. Промывают водой и просушивают фильтровальной бумагой. Микроскопируют.

Микроскопическая картина следующая: капсула розовая, бактериальная клетка синяя.

##### ***Метод Ольта.***

1. Фиксированный мазок красят 25%-ным водным раствором сафрана с подогреванием до образования пара в течение 4 мин.

2. Промывают водой и просушивают фильтровальной бумагой. Микроскопируют.

Микроскопическая картина следующая: капсула желтая, микробная клетка темно-красная.

## Контрольные вопросы

1. Значение сложных методов окрашивания микроорганизмов при бактериологическом исследовании.
2. Техника и практическое значение окрашивания микроорганизмов по Граму.
3. Особенности строения клеточной стенки у грамотрицательных и грамположительных бактерий.
4. Методы окрашивания спор.
5. Методы окрашивания капсул.

### Тема 5. Питательные среды и способы приготовления. Стерилизация питательных сред, материалов и оборудования

**Цель занятия:** изучить состав и технику приготовления питательных сред для культивирования микроорганизмов, устройство, правила, технику безопасности и режим работы аппаратуры, используемой для стерилизации питательных сред, лабораторной посуды и материалов.

**Материалы и оборудование:** автоклав; сушильный шкаф; аппарат Коха; термостат; стерилизаторы; биксы с материалами (марля, вата, салфетки и т. д.); колбы; пробирки; чашки Петри; бумага для упаковки посуды; пробирки и чашки с микробными культурами для стерилизации; набор питательных сред (жидких – МПБ, молоко, пептонная вода, среды Гисса; плотных – МПА, пептон, глюкозный МПА, среда Петра-ньяни, среда Эндо, среда Плоскирева и др.); рН-метр; универсальная индикаторная бумага для определения рН; анаэроустат; демонстрационные слайды, видеоматериал.

**Задание 1.** Ознакомиться с устройством и принципом работы аппарата Коха, печи Пастера, автоклава и другой аппаратурой для стерилизации.

**Задание 2.** Ознакомиться с питательными средами, рецептами их приготовления. Приготовить МПБ, МПА, молоко с метиленовым голубым и другие среды.

**Задание 3.** Определить рН питательных сред.

В природе микроорганизмы получают питательные вещества из распавшихся остатков растений и животных или живут за счет других живых клеток. Для культивирования микроорганизмов в лабораторных условиях применяют специально приготовленные питательные среды (рис. 14).



Рис. 14. Питательные среды

По происхождению питательные среды бывают естественные, искусственные и синтетические. **Естественные** среды – молоко, яйца, сыворотка, желчь, горох, картофель и др. **Искусственные** среды готовят из животных и растительных продуктов по определенным рецептам (МПА, МПБ, МПЖ, картофельный агар и т. д.). Синтетические среды готовят из определенных химических чистых неорганических и органических веществ и соединений (среда Кесслера, среда Эйкмана, агар Сабуро и др.).

По концентрации различают плотные, полужидкие и жидкие питательные среды. **Плотные** среды содержат 2–3 % агар-агара (МПА, молочный агар, среда Эндо, среда Эдварда и др.); **полужидкие** среды – 0,15–0,4 % агар-агара (полужидкие среды Гисса, полужидкий МПА и др.); **жидкие** питательные среды: среда Китта – Тароцци, среда Эйкмана, МПБ, жидкие среды Гисса и т. д.

По назначению питательные среды классифицируют на следующие виды.

1. **Универсальные** (общеупотребительные) среды используются для культивирования большинства микроорганизмов: МПА, МПБ, пептонная вода.

2. **Специальные** (обогащенные) среды – для культивирования отдельных видов плохо или не растущих на обычных средах микроорганизмов: агар Сабуро (для культивирования грибов и актиномицетов), среда Китта – Тароцци (для анаэробов), среда Эдварда (для микоплазм) и т. д.

3. **Элективные** (селективные или избирательные) питательные среды используются для культивирования и накопления микроорганизмов определенного вида. При посеве на них материала, содержащего смесь различных микроорганизмов, раньше всего будет проявляться рост того вида, для которого данная среда будет элективной. Избирательность среды достигается путем создания условий, оптимальных для культивирования определенных микробов (рН, Eh, концентрация солей, состав питательных веществ), т. е. положительной селекцией, или путем добавления в среду

веществ, угнетающих другие микроорганизмы (желчь, высокие концентрации NaCl, антибиотики и др.), т. е. отрицательной селекцией.

К группе селективных сред относятся нижеприведенные.

*Селенитовая среда* – является лучшей средой обогащения для сальмонелл и дизентерийных микробов Зонне. Селенит натрия, содержащийся в среде, стимулирует рост этих бактерий и подавляет рост сопутствующей флоры.

*Висмут-сульфит агар* – содержит соли висмута, бриллиантовую зелень. Сальмонеллы растут на этой среде в виде колоний черного цвета. Другие виды бактерий на этой среде роста не дают.

*Желточно-солевой агар (ЖСА) и молочно-солевой агар (МСА)* – среда для выделения стафилококков, содержит до 10 % хлорида натрия, что подавляет рост большинства бактерий, содержащихся в материале. Кроме того, эта среда является и дифференциально-диагностической, так как присутствие яичного желтка позволяет выявить фермент лецитиназу (лецитовителлазу), который образуют патогенные стафилококки. Лецитиназа расщепляет лецитин на фосфорхолины и нерастворимые в воде жирные кислоты, поэтому среда вокруг лецитиназоположительных колоний мутнеет и появляется опалесцирующая зона в виде радужного венчика.

*Желчный бульон* – селективен для сальмонелл, размножение которых стимулирует добавленная 10%-ная желчь, одновременно тормозящая рост сопутствующих микроорганизмов.

*Щелочной агар и щелочная пептонная вода* – селективны для холерных вибрионов, щелочная реакция среды (рН 9,0) не препятствует росту холерных вибрионов, но тормозит рост других микроорганизмов.

*Среда Петраньяни* (для микобактерий) – состоит из яиц, молока, картофельного крахмала, сока картофеля, пептона (или аспарагина), глицерина и малахитового зеленого. Малахитовый зеленый сдерживает рост других видов бактерий.

**4. Накопительные** – это среды, на которых происходит быстрый рост определенных видов микроорганизмов.

**5. Дифференциально-диагностические** среды применяются для межвидовой дифференциации бактерий: среда Эндо (для идентификации кишечной палочки), агар Плоскирева (для идентификации сальмонелл и бактерий группы кишечной палочки), молоко с метиленовым синим (для диагностики стрептококков) и т. д.

**6. Консервирующие и транспортные среды** предназначены для сохранения микроорганизмов во время транспортировки к месту исследования. Эти среды содержат добавки, предупреждающие размножение и гибель микробов, что способствует сохранению их жизнеспособности. Наибольшее применение нашли глицериновая смесь (среда Тига), фосфатно-буферная смесь и среды Кэри – Блэйра, Амиеса (с активированным углем и без активированного угля), Стюарта и др.

**7. Среды для хранения культур** предназначены для длительного сохранения чистых культур. Цель: максимально замедлить процесс метаболизма, следовательно, и рост культуры.

**Приготовление питательных сред.** Основой большинства питательных сред является мясная вода. Ее готовят из свежей нежирной говядины или конины. Для этого мясо освобождают от фасций, связок, сухожилий, удаляют жир, нарезают мелкими кусочками или пропускают через мясорубку. Взвешивают и заливают двойным количеством воды и оставляют на 18–24 ч в прохладном месте. Затем фарш отжимают, а мясной экстракт кипятят на слабом огне в течение 40–60 мин. Фильтруют и доливают водой до первоначального объема. Разливают по колбам и стерилизуют в течение 30 мин при температуре 120 °С.

*Мясо-пептонный бульон (МПБ)* готовят на мясной воде. К 1 л мясной воды добавляют 1 % пептона, 0,5 % натрия хлорида. Кипятят до растворения пептона, все время при этом помешивая. Устанавливают требуемый показатель рН. Реакцию среды доводят до 7,2–7,6, подщелачивая 10%-ным раствором КОН или NaOH. После добавления щелочи бульон кипятят в течение 5–10 мин и фильтруют через увлажненный дистиллированной водой бумажный фильтр. Затем среду разливают по пробиркам и стерилизуют в течение 20 мин при температуре 120 °С.

*Мясо-пептонный агар (МПА).* Для приготовления его к мясо-пептонному бульону добавляют 2,5–3,0 % мелко нарезанного агар-агара. Агар-агар плавят в бульоне, доводя до кипения, устанавливают требуемый показатель рН, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают по пробиркам в горячем виде и автоклавируют при 1 атм 30 мин. В пробирки для скошенного агара (МПА) разливают по 3–4 мл, для столбика – по 10 мл.

*Мясо-пептонный желатин (МПЖ).* К мясо-пептонному бульону (МПБ) добавляют 10–15 % желатина. Вначале желатин оставляют на 15 мин для набухания, затем растворяют на водяной бане при температуре 50 °С. В горячем виде устанавливают рН 7,3, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, стерилизуют текущим паром три дня по 30–40 мин. Среда применяется для определения протеолитических свойств микробов.

*Среда Китта – Тароцци (МППБ)* используется для культивирования анаэробов. В ее состав входят мясо-пептонный бульон, 0,5 % натрия хлорида, кусочки печени или мышц для адсорбции кислорода. Устанавливают рН 7,6–7,8. На поверхность среды тонким слоем наслаивают вазелиновое масло. Стерилизуют при давлении 0,5 атм в течение 30 мин.

*Агар Сабуро.* В 1 л воды вносят 40 г глюкозы, 10 г пептона, 2 г агар-агара. После растворения агара смесь фильтруют и разливают по пробиркам. Стерилизуют при давлении 0,5 атм в течение 30 мин. После стерилизации рН 6,9–7,0. Используют для выделения и культивирования грибов.

*Молоко с метиленовым голубым.* К 100 мл обезжиренного и профильтрованного молока (рН 7,2–7,4) добавляют 2 мл 1%-ного водного раствора метиленового голубого. Разливают по пробиркам, среду стерилизуют текущим паром, дробно. Используется для определения редуцирующих свойств микробов.

**Краткое описание основных компонентов питательных сред (рис. 15).**

*Пептон* – промежуточный продукт распада белков, представляющий собой смесь полипептидов и аминокислот. Хорошо растворяется в воде и не

свертывается при нагревании. Получают пептон из рубцов крупного и мелкого рогатого скота.

*Желатин* – животный клей, состоящий из белка сухожилий, костей, хрящей. Светло-коричневого цвета, без запаха и вкуса. Плавится при температуре 32–34 °С, застывает при температуре 16 °С.

*Агар-агар* – полисахарид, получаемый из определенных видов морских водорослей. Готовый агар-агар слабо желтого цвета, бывает в виде шнуров, пластинок или порошка.



3

Рис. 15. Основные компоненты питательных сред:

1 – пептон; 2 – желатин; 3, 4 – агар-агар

**Стерилизация** – это процесс, вызывающий гибель патогенных и непатогенных микроорганизмов и их форм. При стерилизации должны соблюдаться следующие условия:

- 1) сохранение физико-химических свойств стерилизуемого материала;
- 2) достижение полной стерильности стерилизуемого материала.

В практике применяются физические и химические методы стерилизации.

#### **Физические методы стерилизации.**

**Фламбирование** (прокаливание на огне). Стерилизуют таким методом обычно бактериологические петли, пинцеты, шпатели, пастеровские пипетки и другие предметы, которые не портятся под действием огня.

**Кипячение.** Для стерилизации используют специальные металлические стерилизаторы, которые нагреваются электричеством или другим источником нагрева. Кипячением стерилизуют шприцы, иглы, хирургические инструменты. В стерилизатор наливают дистиллированную воду, добавляют натрия гидрокарбонат. Продолжительность стерилизации – от 15 мин до 2 ч. При этом погибают вегетативные формы микробов и только часть спор. Металлические предметы во избежание ржавчины опускают в кипящую воду, режущие поверхности оборачивают марлей.

**Стерилизация сухим жаром** проводится в печах Пастера (сушильные шкафы), представляющих собой металлический шкаф с двойными стенками, покрытый теплоизоляционным материалом. Данным методом обезжиривают стеклянную посуду и инструменты (пробирки, чашки Петри, шпатели, пипетки). Стерилизуемый материал заворачивают в бумагу. Стерилизацию проводят при температуре 160–180 °С в течение 1–2 ч. При этом погибают все известные формы микроорганизмов.

**Стерилизация текущим паром** осуществляется в аппарате Коха, представляющем собой металлический цилиндр. На дно цилиндра помещают решетку, на которую ставят стерилизуемый материал. Верхняя крышка имеет форму конуса с отверстием для выхода пара.

Текущим паром стерилизуют питательные среды, свойства которых изменяются при температуре свыше 100 °С. Стерилизацию в аппарате Коха проводят дробно с целью уничтожения не только вегетативных, но и спорообразующих форм микроорганизмов. В первый день материал стерилизуют 30 мин, при этом погибают вегетативные формы микробов, а споры сохраняются. Ко второму дню большинство спор прорастает. На второй день стерилизацию проводят в течение 20 мин, при этом погибают вегетативные клетки, образовавшиеся в результате прорастания спор. На третий день материал стерилизуют 20 мин, при этом погибают оставшиеся вегетативные формы.

**Тиндализация** – дробная стерилизация, которая проводится при температуре ниже 100 °С. Тиндализацию проводят на водяной бане по часу при температуре 60–65 °С в течение пяти дней или при температуре 70–80 °С три дня. Используют для обеззараживания питательных сред, содержащих белок, кровяную сыворотку, витамины, ферменты.

**Стерилизация насыщенным паром под давлением** (автоклавирование) проводится в автоклаве, который представляет собой металлический двустенный котел с крышкой, закрывающейся герметически болтами. В нижней части котла имеются воронка и кран, через которые наливают воду в свободное пространство между внутренним котлом и кожухом. Совместное действие высокой температуры и давления пара обеспечивает уничтожение вегетативных клеток и спор микроорганизмов. С повышением температуры поднимается давление в автоклаве. Давление поддерживается на определенном уровне с помощью предохранительного клапана. При давлении 0,5 атм температура достигает 110–112 °С (стерилизуют среды с желатином, молочно-дрожжевой автолизат, среды с сахаром и витаминами); 1 атм – 120 °С (мясо-пептонный агар); 1,5 атм – 126–127 °С (картофельная среда, физиологический раствор, стеклянная посуда, перевязочный материал, хирургические инструменты и т. д.).

**Пастеризация** – это метод неполной стерилизации, предложенный Л. Пастером. При пастеризации погибают только вегетативные формы микробов, а споры сохраняются. Этот метод применяют для выделения спорообразующих форм микроорганизмов, а в пищевой промышленности – для обработки продуктов, теряющих питательную ценность при кипячении (молоко и молочные продукты, мясо, консервированные овощи и фрукты, соки, вино, пиво).

Различают длительную пастеризацию – 30 мин при температуре 65 °С, кратковременную – 20 с при температуре 75 °С, мгновенную – без выдержки при температуре 80–90 °С. Пастеризованные продукты быстро охлаждают до температуры 4–5 °С, чтобы предотвратить прорастание спор.

**Стерилизация фильтрованием через пористые фильтры** применяется в том случае, если нет возможности использовать другие методы стерилизации. Способ заключается в фильтровании жидкостей через специальные фильтры, задерживающие клетки бактерий, но пропускающие вирусы и фильтрующиеся формы бактерий. К пористым фильтрам относят фильтры Зейтца, мембранные ультрафильтры.

**Стерилизация ультрафиолетовыми лучами, ультразвуком, гамма-лучами, током высокой частоты** применяется в медицине, ветеринарии, пищевой промышленности для обеззараживания воздуха в помещениях, воды и сточных вод, молока и других жидких сред.

**Химические методы стерилизации.**

**Химическая стерилизация** – это уничтожение микроорганизмов при помощи химических веществ. Она применяется:

- 1) для дезинфекции помещений, оборудования, рук персонала (растворы йода, хлорной извести, этиловый спирт, перекись водорода и т. д.);
- 2) консервирования крови, молока, тканей, органов (растворы формальдегидов, формалина, гепарин, цитрат натрия, глицерин и т. д.).

**Порядок выполнения работы.**

Приготавливают мясную воду, из которой готовят МПА и МПБ. Устанавливают необходимый уровень рН питательной среды путем добавления щелочи. Разливают среды по пробиркам (10–15 мл) и стерилизуют.

### **Контрольные вопросы**

1. Классификация питательных сред.
2. Какие среды называются элективными? Приведите примеры.
3. Стерилизация. Условия стерилизации.
4. Методы стерилизации.
5. Физические методы стерилизации.
6. Сущность метода дробной стерилизации.
7. Автоклавирование: суть метода.
8. Аппаратура, используемая для различных видов стерилизации.
9. Флампирование, кипячение, пастеризация, тиндализация и их использование.
10. Методы стерилизации питательных сред.
11. Методы стерилизации стеклянной посуды и инструментов.
12. Химические методы стерилизации и их использование.

### **Тема 6. Техника посева микроорганизмов на различные питательные среды. Режимы культивирования микроорганизмов**

**Цель занятия:** отработать технику посева и пересева микроорганизмов на различные питательные среды. Изучить режимы культивирования микроорганизмов различных групп.

**Материалы и оборудование:** пробирки с микробной культурой (сенная бацилла, молочнокислый стрептококк, ацидофильная палочка и др.); пробирки с МПБ; чашки Петри; МПА; микробиологические иглы; микробиологические петли; восковые карандаши; пробирки с МПА столбиком; термостат; горелки; демонстрационные таблицы.

**Задание 1.** Произвести посев микроорганизмов на плотные питательные среды (петлей на питательную среду в чашке Петри, в толщу питательной среды, уколом в столбик питательной среды, шпателем на питательную среду).

**Задание 2.** Произвести посев микроорганизмов на жидкие питательные среды.

**Задание 3.** Изучить устройство и принцип работы термостата и приборов для культивирования анаэробов.

Посев микробов на искусственные питательные среды является самым распространенным методом бактериологической техники исследования. Посевы производят бактериологическими платиновыми или нихромовыми петлями, а также пастеровскими пипетками. Если материал жидкий, то он без

подготовки пригоден для посева. Плотный материал сначала эмульгируют в физиологическом растворе или растирают в ступке с последующим его добавлением.

Основным требованием при посеве и пересеве является стерильность. Перед работой моют руки и надевают чистый проглаженный халат. Во время работы не разговаривают, не делают резких движений, дышат только через нос.

Для роста и размножения микроорганизмов на естественных и искусственных питательных средах необходимы определенные температурные условия. Наиболее благоприятной температурой для большинства патогенных микробов является 37 °С, плесневых грибов – 20–25, сапрофитов – 25–30, термофилов – 40–45 °С.

Для культивирования микробов при постоянной температуре используют термостаты.

Термостаты состоят из корпуса, рабочей камеры, электромонтажного блока, который осуществляет автоматическое терморегулирование. Корпус термостата имеет стенки, между которыми циркулирует теплый воздух, образуемый теплонагревателем, расположенным в нижней части средней камеры. Средняя камера от наружной стенки отделена теплоизоляционным материалом. Термостат имеет двери: внутреннюю стеклянную и двойную наружную, заполненную теплоизоляционным материалом. В рабочей камере термостата находится три перфорированные съемные полки, выполненные из листов полированной латуни. В верхней части корпуса помещается контрольный термометр.

На панели электромонтажного блока расположен тумблер включения и выключения сети, сигнальные лампы, кнопка подсвета термометра, ручки настройки терморегулирующего устройства. Термостат при установке должен быть заземлен.

По характеру дыхания все микробы делятся на аэробов и анаэробов. Аэробы для своего существования нуждаются в кислороде. Анаэробы растут и размножаются в условиях, исключающих доступ кислорода воздуха. Молекулярный кислород оказывает на них токсическое действие.

Для культивирования анаэробов необходимо создать определенные условия, сущность которых заключается в удалении молекулярного кислорода из питательной среды и пространства, окружающего эти культуры.

Отличительной особенностью питательных сред, применяемых для культивирования анаэробов, является пониженное содержание в них свободного кислорода. Наиболее простым способом удаления растворенного кислорода является кипячение среды. Непосредственно перед посевом материала пробирки с питательными средами кипятят в водяной бане в течение 15–20 мин. При кипячении из среды вытесняется воздух и, следовательно, удаляется кислород. Среду быстро охлаждают, чтобы не дать ей насытиться кислородом воздуха, и используют для посева. Для уменьшения диффузии кислорода из воздуха питательные среды заливают сверху

стерильным вазелиновым или парафиновым маслом (толщина слоя 1,0–1,5 см). Засев среды проводят пипеткой сквозь масло в наклонном положении пробирки.

Активно связываются с кислородом животные ткани паренхиматозных органов (среда Китта – Тароцци). В жидкие питательные среды помещают иногда пористые вещества – вату, пемзу, которые адсорбируют на своей поверхности пузырьки воздуха.

#### **Приборы для культивирования микробов-анаэробов.**

*Прибор Аристовского* представляет собой металлический цилиндр, диаметр которого соответствует диаметру чашек Петри. Внутри прибора имеется специальное ведерко для размещения чашек. Закрывается прибор металлической крышкой с резиновой прокладкой и винтовой нарезкой, обеспечивающей полную герметичность внутренней камеры.

Поглощение кислорода в аппарате Аристовского осуществляется химическими поглотителями. Две половинки от чашек Петри наполняют углекислой содой, на поверхность которой насыпают тонкий слой гидросульфата натрия в количестве 1,5 г и слегка увлажняют водой из пульверизатора. Одну половинку чашки с содой ставят на дно ведерка и на нее помещают чашки Петри с посевами; вторую половину чашки помещают поверх засеянных чашек. После этого ведро опускают в аппарат, герметически закрывают его крышкой и ставят в термостат.

*Анаэроstat* представляет собой толстостенный металлический цилиндр с герметически привинчивающейся крышкой, на которой имеются вакуумметр и два крана для присоединения к вакуум-насосу. В прибор помещают чашки с посевами, откачивают воздух, кран закрывают, ставят в термостат для культивирования анаэробов при определенной температуре.

**Порядок посева на плотные питательные среды.** Плотные питательные среды используют для посева материала на их поверхность и в толщу среды.

*Посев петлей на среду в чашку Петри.* Для равномерного распределения микроорганизмов в жидкой среде пробирку с культурой осторожно, чтобы не смочить пробку, встряхивают или, зажав между ладонями, вращают в одну, а затем в другую сторону. Все манипуляции, связанные со взятием и посевом материала, производят над пламенем горелки в радиусе 10–15 см.

Пробирку с культурой бактерии держат в левой руке, а бактериологическую петлю – в правой. Петлю обеззараживают над пламенем горелки. Край пробирки при вынимании пробки прижигают. Пробку прижимают мизинцем правой руки к ладони и после извлечения держат в руке. Петлю осторожно вводят в пробирку с культурой и охлаждают. При взятии материала на петле образуется тонкая прозрачная пленка – «зеркальце». Чашку Петри с агаровой средой, заранее подписанную, приоткрывают под углом во избежание попадания микробов извне (рис. 16, а). Бактериологическую петлю кладут плашмя на питательную среду, чтобы не поцарапать ее поверхность, и проводят штрихи по всей среде.



а

б

Рис. 16. Посев на плотную среду

Штрихи, наносимые петлей, должны располагаться как можно ближе друг к другу (рис. 16, б), так как это удлиняет общую линию посева и дает возможность получить на поверхности среды изолированные колонии микробов.

Окончив посев, петлю фламбируют, чтобы уничтожить оставшиеся на ней микроорганизмы, и ставят в штатив. Пробирку закрывают, предварительно обеззаразив ее края и ту часть пробки, которая входит в горлышко пробирки.

Чашку Петри с посевами переворачивают вверх дном, во избежание размыва колонии конденсационной водой, и ставят в термостат для культивирования.

**Посев микробной культуры в толщу плотной питательной среды.** Из бактериальной культуры, подлежащей посеву, готовят взвесь в стерильной водопроводной воде или в физиологическом растворе.

Набирают культуру бактерий стерильной пипеткой в объеме 0,1; 0,5 или 1,0 мл (в зависимости от предполагаемого микробного загрязнения) и выливают в пустую стерильную чашку Петри. Чашку заливают 10–15 мл мясо-пептонного агара, расплавленного и остуженного до 40–45 °С (при такой температуре, если приложить пробирку со средой к щеке, она не должна вызывать ощущения ожога). Для равномерного распределения исследуемого материала в питательной среде закрытую чашку слегка вращают круговыми движениями

по поверхности стола. После застывания чашку Петри со стороны дна подписывают, переворачивают вверх дном и ставят в термостат для культивирования.

***Посев уколом в столбик питательной среды.*** Пробирку с питательной средой, застывшей в виде столбика, берут в левую руку и в центр столбика до дна пробирки вкалывают петлю с находящимся на ней материалом. Пробирку закрывают пробкой, в верхней трети пробирку подписывают маркером. Ставят пробирку в штатив и помещают в термостат для инкубирования.

***Посев шпателем на среду в чашку Петри.*** Исследуемую микробную культуру наносят на поверхность питательной среды у края чашки. Стерильным шпателем распределяют ее равномерно по всей поверхности среды. Чашку подписывают, переворачивают вверх дном и помещают в термостат для выращивания.

При обилии в засеваемом материале микробов они растут в виде пленки, покрывающей всю поверхность питательной среды (как трава на газоне). Такой характер микробного роста получил название сплошного, или газонного. Посев газоном производят в том случае, когда нужно получить большие количества микробной культуры одного вида.

***Посев в жидкую питательную среду.*** При посеве в жидкую питательную среду обе пробирки (одна с исследуемой культурой, другая с питательной средой) берут в левую руку между большим и указательным пальцами так, чтобы их основания находились поверх кисти руки. Все действия проводят над пламенем горелки (радиус 10–15 см). Пробки из пробирок вынимают мизинцем и безымянным пальцами правой руки, не прикасаясь к той части пробки, которая входит внутрь пробирки. Края пробирок при вынимании пробок прожигают. Остальные три пальца правой руки остаются свободными для взятия петли или пипетки, посредством которых материал переносят из одной пробирки в другую и распределяют в питательной среде. Бактериальную петлю прокалывают на огне непосредственно перед взятием материала. Чтобы остудить горячую петлю, ее вводят вглубь пробирки и погружают в конденсационную жидкость. При взятии петель материала для посева должна образоваться в кольце петли тонкая прозрачная пленка – «зеркальце». Петлю с находящимся на ней материалом погружают в питательную среду. Если материал вязкий и с петли не снимается, его растирают на стенке пробирки и смывают жидкой средой. Пробирки закрывают пробками, предварительно профламбировав их края. Петлю обеззараживают и ставят в штатив. Пробирку с посевами подписывают перманентным маркером и помещают в термостат для культивирования.

### **Контрольные вопросы**

1. Рост микроорганизмов.
2. Размножение микроорганизмов.

3. Техника посева микроорганизмов разными методами на плотные питательные среды.
4. Техника посева микроорганизмов на жидкие питательные среды.
5. Режимы культивирования микроорганизмов.
6. Методы создания анаэробных условий для культивирования анаэробных микробов.
7. Назначение, устройство и принцип работы термостата.
8. Инструмент и приборы для посева и культивирования микроорганизмов на искусственных питательных средах.

## **Т е м а 7. Культуральные свойства микроорганизмов. Методы выделения чистых культур**

**Цель занятия:** изучить особенности роста микроорганизмов на различных питательных средах, методы выделения чистых культур.

**Материалы и оборудование:** посеvy культур микроорганизмов на различные питательные среды; никромовые бактериологические петли; предметные стекла; набор красок для окрашивания микроорганизмов; пробирки с 9 мл стерильной воды или изотонического раствора хлорида натрия; стеклянные шпатели; микробиологические пипетки; маркеры; суспензии смешанных культур микробов; газовые горелки; микроскопы; термостат; демонстрационные слайды; видеоматериал.

**Задание 1.** Описать культуральные свойства разных видов микроорганизмов, культивируемых на плотных, жидких и полужидких питательных средах.

**Задание 2.** Выделить чистую культуру микроорганизмов методом рассева, разведения, применения элективных питательных сред.

**Задание 3.** Приготовить препараты-мазки. Окрасить по Граму. Микроскопировать и зарисовать в тетради.

**Методика изучения культуральных свойств микробов.** Культуральные признаки микроорганизмов определяются характером роста их на плотных, жидких и полужидких питательных средах. Культуральные свойства характерны для каждого вида микроба и поэтому являются важным видовым признаком.

**Рост микробов на плотной питательной среде.** Чашки с посевами просматривают сначала невооруженным глазом или через лупу, затем помещают их на столик микроскопа вверх дном и исследуют колонии в проходящем свете с объективом малого увеличения и суженой диафрагмой.

Колонии характеризуют по следующим признакам: размер, форма, прозрачность, контур края, рельеф, поверхность, цвет, структура и консистенция.

*Размеры колонии* определяются ее диаметром. В зависимости от диаметра различают колонии: точечные (диаметр меньше 1 мм), мелкие (диаметр 1–2 мм), средние (диаметр 2–4 мм), крупные (диаметр 4–6 мм и более).

*Форма колоний:* круглая, овальная, ветвистая, амёбовидная и др.

*Характер контура края колоний:* ровный, изрезанный, лопастный, локонообразный, бахромчатый и т. д.

*Рельеф колонии* характеризуется приподнятостью ее над поверхностью среды и контуром формы в вертикальном разрезе. Рельеф колонии определяется невооруженным глазом или через лупу при рассмотрении ее сверху и сбоку. Различают колонии: каплеобразные, куполообразные, конусообразные, с вдавленным центром.

*Поверхность колоний:* ровная или складчатая, матовая или блестящая, сухая или влажная и т. д.

*Прозрачность колоний:* прозрачные или непрозрачные в разной степени.

*Консистенция колоний:* пастообразная, вязкая, слизистая, волокнистая, плотная, хрупкая, сухая и т. д. Консистенцию колонии определяют посредством прикосновения или взятия из нее части материала бактериологической петлей.

*Цвет колоний* определяется пигментом, который продуцирует культура микробов. Красный цвет образуют некоторые актиномицеты, дрожжи, бактерии. Синий цвет продуцирует синегнойная палочка, желтый и золотисто-желтый образуют стафилококки, сарцины. Черные и бурые пигменты вырабатывают некоторые грибы, азотобактер и другие микроорганизмы. Большинство патогенных бактерий пигмента не образуют, вследствие чего колонии их бесцветны или молочно-мутного цвета.

### **Особенности микробного роста на жидких питательных средах.**

*Поверхностный рост:* пристеночное кольцо, нежная пленка, грубая морщинистая пленка, поверхностный рост отсутствует.

*Помутнение среды:* слабое, умеренное, сильное, стойкое, отсутствует.

*Осадок:* плотный, зернистый, вязкий, в виде клочка ваты, в виде хлопьев, крошковатый и т. д.

*Количество осадка:* обильное, скудное, осадок отсутствует.

*Цвет среды:* не изменен, изменен (приобретает окраску пигмента, образуемого микроорганизмом).

*Газообразование:* наличие или отсутствие пузырьков газа.

### **Рост микробов на полужидкой питательной среде.**

*Форма колоний:* круглые, овальные, разветвленные.

*Размеры колоний:* точечные, средние, крупные.

*Края:* ровные, разорванные, лопастные, зубчатые.

*Поверхность:* матовая, блестящая, ровная или складчатая.

*Разжижение среды:* быстрое, медленное, отсутствует.

**Особенности роста микроорганизмов по уколу.** В верхней части растут аэробы, в нижней – анаэробы.

*Стержень:* длинный, короткий, в виде плоской ленты и т. д.

*Боковые отростки:* длинные, короткие, в виде ершика, елочки, елочки вершиной вниз и т. д.

*Разжижение среды:* не разжижает, разжижает полностью, послойно, воронкой, кратером и т. д.

*Газообразование:* наличие или отсутствие пузырьков газа.

**Чистая культура.** Чистой культурой микробов называют популяцию микроорганизмов, принадлежащих к одному виду.

Примером чистой культуры может служить изолированная колония, которую принято рассматривать как потомство одной клетки, попавшей на данный участок питательной среды (рис. 17).

Выделение чистой культуры является важным этапом бактериологического исследования. Чистая культура необходима для изучения основных морфологических, культуральных и биохимических признаков, по совокупности которых определяется видовая принадлежность микроорганизмов.



Рис. 17. Чистая культура аспергилл

Чистые культуры микроорганизмов необходимы для приготовления лечебных сывороток, профилактических вакцин, диагностических препаратов, получения в производственных условиях спирта, витаминов, ферментов, антибиотиков, кормового белка и других веществ.

**Порядок учета культуральных свойств микроорганизмов.**

К культуральным (или макроморфологическим) свойствам относятся характерные особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах. На поверхности плотных питательных сред, в зависимости от посева, микроорганизмы могут расти в виде колоний, штриха или сплошного газона. Колонией называют изолированное скопление клеток одного вида, выросших из одной клетки (клон клеток). В зависимости от того, где растет микроорганизм (на поверхности плотной питательной среды или в толще ее), различают поверхностные, глубинные и донные колонии. Колонии, выросшие на поверхности среды, отличаются разнообразием: они видоспецифичны и их изучение используется для определения видовой принадлежности исследуемой культуры.

Описывают характер роста микроорганизмов, культивируемых на различных питательных средах, по предложенным схемам. Зарисовывают в тетради особенности роста микробов на плотной питательной среде.

Из описанных колоний приготавливают мазки. Окрашивают сложным методом по Граму. Микроскопируют. Определяют видовую принадлежность. Зарисовывают в тетради.

### **Методы выделения чистых культур.**

1. *Метод рассева (фракционный метод)*. Берут несколько чашек Петри с плотной питательной средой (МПА). На агар в центре первой чашки наносят пастеровской пипеткой каплю исследуемой культуры и стерильным шпателем каплю распределяют по всей поверхности среды.

Не фламбрируя шпатель, быстро переносят его во вторую чашку и распределяют оставшийся на нем материал по всей поверхности агара. Затем этим же шпателем производят посев в третью и четвертую чашки. Когда посев закончен, шпатель обжигают над пламенем горелки. Чашки маркируют и ставят в термостат вверх дном на 18–24 ч.

В последние чашки попадает меньше микробов, а следовательно, меньше вырастает колоний. Они могут быть изолированы, что позволяет выделить чистую культуру. При расसेве происходит механическое разделение микроорганизмов.

2. *Метод разведения*. Исследуемый материал разводят в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида. Вносят 1 мл исследуемого материала стерильной пипеткой в пробирку с 9 мл стерильного физиологического раствора. Получают разведение  $10^{-1}$ . Из пробирки с разведением  $10^{-1}$  переносят 1 мл в пробирку с 9 мл стерильного физиологического раствора. Получают разведение  $10^{-2}$ .

Аналогично приготавливают последующие разведения:  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  и т. д.

С увеличением степени разведения число микробов уменьшается, что позволяет изолировать отдельные бактериальные клетки и выделить культуру в чистом виде.

Из последних разведений культуры делают посевы в чашки Петри бактериологической петлей. Чашки подписывают маркером, переворачивают вверх дном и помещают в термостат при температуре 35–37 °С на 18–24 ч.

Чашки с посевами просматривают, сходные между собой колонии описывают, делают препараты-мазки, окрашивают и микроскопируют. При однородности культуры делают пересев.

3. *Метод применения элективных питательных сред*. Не все микроорганизмы растут на простых питательных средах. Для выделения и накопления микробов определенного вида используют элективные, или избирательные, среды.

Элективной средой для молочнокислых бактерий может быть молоко. Плесневые грибы и дрожжи выращивают на средах с содержанием углеводов (пивное сусло, сусло-агар).

Для культивирования микобактерий применяют плотную яично-молочную среду Петраньяни.

На картофельной среде Рушмана выращивают маслянокислые бациллы.

Среда Китта – Тароцци применяется для культивирования анаэробов.

Делают посевы на элективные питательные среды суспензии смешанных бактериальных культур.

Культивируют в термостате при температуре 35–37 °С в течение 18–24 ч. Просматривают посевы, описывают культуральные свойства выросших колоний, готовят препараты-мазки, окрашивают и микроскопируют. Микроскопическую картину зарисовывают в тетради.

### **Контрольные вопросы**

1. Культуральные свойства микроорганизмов.
2. Особенности роста микроорганизмов на плотных питательных средах.
3. Характер роста микробов на жидких питательных средах.
4. Особенности микробного роста на полужидких питательных средах.
5. Рост микроорганизмов по уколу.
6. Понятие «чистая культура».
7. Применение чистых культур в животноводстве, ветеринарии, медицине, народном хозяйстве.
8. Элективные питательные среды.
9. Методы выделения чистой культуры.

### **Тема 8. Биохимические свойства микроорганизмов**

**Цель занятия:** изучить протеолитические, сахаролитические и редуцирующие свойства микроорганизмов.

**Материалы и оборудование:** питательные среды (среда Гисса, среда Эндо, молоко с метиленовым голубым); культура микроорганизмов; бактериологические петли; реактив Несслера; фильтровальная бумага, обработанная раствором уксуснокислого свинца; фильтровальная бумага, обработанная горячим насыщенным 12%-ным водным раствором щавелевой кислоты; набор красок для окрашивания микроорганизмов; газовые горелки; восковые карандаши; микроскопы; термостат; демонстрационные таблицы.

**Задание 1.** Определить сахаролитические свойства микроорганизмов на средах Гисса.

**Задание 2.** Изучить протеолитические свойства микробов (методика определения аммиака, сероводорода, индола и др.).

**Задание 3.** Освоить методику определения редуцирующих свойств микроорганизмов.

Для определения вида бактерий, кроме изучения их формы, размеров, подвижности, отношения к окраске по Граму, характера роста на простых питательных средах, большое значение имеет также изучение их биохимических свойств.

Биохимические свойства микроорганизмов – это способность производить расщепление и синтез различных химических веществ при помощи своих же ферментов.

Изучение этих свойств микробов имеет большое значение в технологии некоторых производств (в виноделии, пивоварении, молочной промышленности, микробиологическом синтезе белка, ферментов, витаминов и др.), а также для дифференциации видов микроорганизмов.

Состав ферментов, синтезируемый любой бактерией, определяется ее геномом и является довольно стабильным признаком. Бактерии синтезируют разнообразные ферменты, принадлежащие к шести основным классам.

Определение сахаролитических, протеолитических и других ферментов, образуемых определенными видами и даже вариантами (биоварами) бактерий, имеет важное таксономическое значение, широко применяясь в систематике и идентификации. Целый ряд ферментов (гиалуронидаза, коагулаза, фибринолиз и др.) способствуют проявлению патогенных свойств бактерий, поскольку мишенью их действия являются клетки и ткани макроорганизма. Эти ферменты называют **ферментами патогенности**.

Ферменты бактерий могут локализоваться в цитоплазме, цитоплазматической мембране или периплазматическом пространстве бактерий, это так называемые **эндоферменты**, другие – **экзоферменты** – выделяются в окружающую среду.

Функциональное значение экзоферментов связано с расщеплением макромолекул органических и неорганических веществ в окружающей среде до более простых соединений. Они осуществляют контактное и внеклеточное переваривание веществ, повреждают ткани своих хозяев и др.

У бактерий различают три основные группы ферментов:

- **конститутивные** – постоянно синтезируемые бактериальной клеткой;
- **индуцибельные** (адаптивные) – синтез которых индуцируется соответствующим субстратом;
- **репрессибельные** – синтез которых подавляется в результате избыточного накопления продукта реакции, катализируемой данным ферментом.

Одной из особенностей синтеза бактериальных ферментов является преобладание индуцибельных ферментов над конститутивными, что связано как с малым объемом протоплазмы, так и с их ролью главного механизма адаптации к меняющимся условиям внешней среды.

Другой особенностью синтеза ферментов у гетеротрофных бактерий является их выделение в огромном количестве в окружающую среду. Ферменты могут функционировать независимо друг от друга или быть тесно связанными между собой, обеспечивая протекание метаболических реакций в строгой последовательности. Последние называют «мультиферментные комплексы», например ферменты дыхательной цепи, локализованные на цитоплазматической мембране.

Определение ферментов используют для идентификации бактерий – возбудителей инфекционных болезней, помимо изучения морфологических и культуральных свойств.

К биохимическим свойствам относят: сахаролитические, протеолитические свойства, пигментообразование, токсинообразование.

При биохимической дифференциации микробов определяют их свойства:

1) сахаролитические – способность сбраживать углеводы с образованием кислоты и газа или только кислоты;

2) протеолитические – способность разлагать белковые продукты с образованием сероводорода, индола и других веществ;

3) редуцирующие – способность восстанавливать некоторые химические вещества (краски и др.).

**Сахаролитические свойства микробов** определяют путем посева чистой культуры на специальные среды, содержащие различные углеводы (лактозу, сахарозу, глюкозу, мальтозу, маннит и др.) и индикатор (нейтральный красный, лакмус, фуксин основной и др.).

Наиболее распространенной является среда Гисса, которая представляет собой смесь сахара и индикатора в пептонной воде. Для улавливания газа на дно пробирки со средой опускают «газовки» – поплавки для улавливания газа. Образовавшийся в процессе ферментации газ вытесняет часть среды и скапливается вверху «газовки». При этом разложение микроорганизмами углевода сопровождается цветной реакцией благодаря присутствию индикатора.

В зависимости от вида микроорганизмов сбраживание углеводов происходит с образованием различных продуктов, в основе которых лежат различные виды брожений (спиртовое, уксуснокислое, молочно-кислое и др.).

Бактерии характеризует неодинаковая способность использовать различные углеводы. Ферментация углеводов бактериями приводит к образованию органических кислот либо кислот и газов. Определение сахаролитических ферментов проводят на дифференциально-диагностических средах Гисса. Среда Гисса состоит из 1 % пептонной воды, 0,5 % определенного углевода (глюкоза, лактоза, мальтоза, сахароза и др.), индикатора Андресе (кислый фуксин в 1 н. растворе NaOH). В пробирку со средой опускают поплавок (стеклянная трубочка, один конец которой запаян) для улавливания газообразных продуктов. Свежеприготовленная среда имеет соломенно-желтый цвет. Исследуемую культуру засевают в пробирку. Результаты посевов учитываются через 24–48 ч. О разложении углеводов судят по изменению цвета среды. Среда приобретает красный цвет, в результате сдвига pH в кислую сторону, за счет образования кислоты. О газообразовании свидетельствует накопление газа в поплавке.

**Протеолитические свойства.** Разложение белковых веществ (протеолиз) выявляют посевом на питательные среды: мясо-пептонный желатин, молоко или свернутую лошадиную сыворотку. Протеолиз проявляется в разжижении желатина.

При росте в молоке микроорганизмы (некоторые виды кокков и др.), вырабатывающие протеолитические ферменты, через несколько дней вызывают пептонизацию молока (растворение сгустков казеина и просветление).

Протеолиз протекает неодинаково: под действием некоторых видов бактерий образуются конечные продукты распада – индол, сероводород, аммиак. Для обнаружения этих продуктов производят посев изучаемого

микроба на мясо-пептонный бульон или пептонную воду и после 2–3-суточного выдерживания в термостате исследуют с помощью соответствующих реактивов.

Протеолитические ферменты – протеазы, катализирующие расщепление белка. На практике о протеолитической активности бактерий чаще судят по способности расщеплять белок до продуктов глубокого распада: индола и сероводорода. Для этого исследуемую культуру засевают на МПБ, между пробкой и горлышком пробирки укрепляют индикаторные бумажки. Для определения сероводорода индикаторная бумага пропитана уксуснокислым свинцом. При выделении  $H_2S$  она чернеет. Для определения индола индикаторная бумага пропитана раствором щавелевой кислоты, при выделении индола она краснеет.

**Редуцирующие свойства микробов.** Редукцией, или восстановлением, того или иного вещества называется химический процесс, состоящий в отнятии кислорода от данного вещества или замене его водородом. Имеются вещества, которые при редукции легко обесцвечиваются.

Наиболее пригодными для определения редуцирующей способности микробов являются метиленовая синька, нейтральрот, лакмус и др. Эти вещества добавляют к жидким или плотным питательным средам, на которые производят посевы исследуемых культур.

#### **Порядок выполнения работы.**

**Определение сахаролитических свойств.** Культуру микроорганизмов высевают на жидкие среды Гисса. Помещают в термостат при температуре 25–30 °С (для патогенных микроорганизмов – 37 °С). Определяют в каждой пробирке происшедшие изменения, указывают наличие кислотообразования, которое видно по покраснению среды, буквой «К», и газообразования, в том случае, если поплавков заполнен газом, буквой «Г».

Приготавливают препарат-мазок, окрашивают по Граму. Микроскопируют и определяют морфологию микроба. Зарисовывают микроскопическую картину в тетради.

#### **Определение протеолитических свойств микробов.**

**Методика определения аммиака.** Аммиак в среде с бактериальной культурой определяют при помощи реактива Несслера. Для этого в фарфоровую чашку пипеткой вносят каплю культуры, выращенной на мясо-пептонном бульоне, и каплю реактива Несслера.

При наличии аммиака смесь окрашивается в желтый или коричневый цвет. Коричневое окрашивание указывает на большое содержание продукта гнилостного распада.

**Методика определения сероводорода.** Над культурой исследуемых микробов помещают полоску фильтровальной бумаги, смоченную раствором уксуснокислого свинца (бумага закрепляется между пробкой и стенкой пробирки). Пробирки помещают до трех суток в термостат. Почернение бумаги происходит при содержании сероводорода, который превращает уксуснокислый свинец в сернокислый.

*Методика определения индола.* Определение по методу Морелли осуществляют с помощью полоски фильтровальной бумаги, обработанной горячим насыщенным 12%-ным водным раствором щавелевой кислоты и высушенной в термостате. Бумагу закрепляют между пробкой и стенкой пробирки. Пробирки с исследуемой культурой помещают в термостат на трое суток. Порозовение нижней части индикаторной бумаги указывает на наличие индола.

*Методика определения редуцирующих свойств микроорганизмов.* Производят посев исследуемой культуры микробов на среду молоко с метиленовой синькой. Пробирки с посевами помещают в термостат на трое суток. Микроорганизмы, образующие ферменты оксидазы и дегидразы, окисляют одни органические вещества в среде и восстанавливают другие. При этом молоко обесцвечивается и приобретает кремовый или белый цвет.

### **Контрольные вопросы**

1. Ферменты микроорганизмов.
2. Сахаролитические свойства микроорганизмов.
3. Протеолитические свойства микроорганизмов.
4. Редуцирующие свойства микроорганизмов.
5. Значение и применение биохимических свойств микроорганизмов в бактериологической диагностике, животноводческой практике.

### **Тема 9. Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы.**

#### **Чувствительность микробов к антибиотикам и фитонцидам**

**Цель занятия:** изучить влияние физических, химических и биологических факторов на рост и развитие микроорганизмов. Определить чувствительность микроорганизмов к антибиотикам и фитонцидам.

**Материалы и оборудование:** пробирки с культурами микробов (гнилостная микрофлора, молочнокислая микрофлора); мясо-пептонный агар; мясо-пептонный агар с глюкозой; чашки Петри; бактериологические петли; 0,1 н. раствор кислоты; 0,1 н. раствор щелочи; 1%-ный раствор хлорной извести; набор бумажных дисков, пропитанных различными антибиотиками (пенициллин, ампициллин, стрептомицин, эритромицин и др.); стерильные пинцеты; дистиллированная вода; шпатели; восковые карандаши; горелки; термостаты; микроскопы; демонстрационные таблицы.

**Задание 1.** Определить отношение микроорганизмов к температуре и кислороду.

**Задание 2.** Определить влияние химических факторов на рост и развитие микроорганизмов.

**Задание 3.** Определить влияние биологических факторов на рост и развитие микроорганизмов (антагонизм между гнилостной и молочнокислой микрофлорой).

**Задание 4.** Определить чувствительность микроорганизмов к антибиотикам.

## **Задание 5.** Определить чувствительность микроорганизмов к фитонцидам.

Микроорганизмы постоянно подвергаются воздействию факторов внешней среды.

Температура – наиболее важный фактор в жизни микробов. Она может быть оптимальной, т. е. наиболее благоприятной для развития, а также максимальной, когда подавляются жизненные процессы, и минимальной, ведущей к замедлению или прекращению роста. По отношению к температуре микроорганизмы делят на три группы.

*Психрофилы* (холодолюбивые микроорганизмы) растут при низких температурах (от +15 до –8 °С). Они распространены в северных морях, ледниках, холодильниках и других местах. Среди них могут быть возбудители болезней рыб и водных растений, микроорганизмы, разлагающие пищевые продукты.

*Мезофилы* развиваются при средних температурах окружающей среды – от 20 до 40 °С. Мезофилы являются возбудителями болезней животных и человека, вызывают процессы брожения, аммонификации и др.

*Термофилы* (теплолюбивые) растут при высоких температурах (40–80 °С). Обитают в горячих источниках, в почвах районов с жарким климатом, в пищеварительном тракте животных. Участвуют в процессах приготовления бурого сена, силосования кормов, биологического обеззараживания навоза и т. д.

Микроорганизмы приспособились к определенной среде обитания. Большинство микробов предпочитают среду, в которой концентрация водородных ионов ближе к нейтральной (рН 6,5–7,5). В условиях лаборатории микроорганизмы культивируют на средах, содержащих определенное количество водородных ионов. Для этого в среды добавляют химические вещества: щелочи – для повышения рН, кислоты – для понижения рН. Оптимальная рН среды для молочнокислых микроорганизмов равна 3,5–4,5, плесневых грибов – 3,5–5,0, ацидофильной палочки – 4,0–4,5, кишечной палочки – 6,5–7,8.

Растворы щелочей и кислот оказывают бактерицидное действие на микроорганизмы, вызывают денатурацию белков, разрушают углеводы. Растворы хлорной извести окисляют компоненты микробной клетки, в результате наступает ее гибель. Формалин – 40%-ный водный раствор формальдегида – вызывает денатурацию белков, губительно действует на все формы микроорганизмов.

Между микроорганизмами и другими живыми организмами существуют разнообразные взаимоотношения: **симбиоз, комменсализм, метабиоз, сателлизм, синергизм, антагонизм, паразитизм** и др.

**Антибиотики** – это специфические соединения, способные в незначительных количествах избирательно задерживать рост или убивать микробы. Антибиотические вещества образуются микроорганизмами: актиномицетами, плесневыми грибами, бациллами, бактериями, а также растениями и животными.

## **Основные классификации антибиотиков.**

В основу классификации антибиотиков также положено несколько разных принципов.

*По способу получения их делят:*

- на природные;
- синтетические;
- полусинтетические (на начальном этапе получают естественным путем, затем синтез ведут искусственно).

*Продуценты антибиотиков:*

- по преимуществу актиномицеты и плесневые грибы;
- бактерии (полимиксины);
- высшие растения (фитонциды);
- ткани животных и рыб (эритрин, эктерицид).

*По направленности действия:*

- антибактериальные;
- противогрибковые;
- противоопухолевые.

*По спектру действия* – числу видов микроорганизмов, на которые действуют антибиотики:

- препараты широкого спектра действия (цефалоспорины 3-го поколения, макролиды);
- препараты узкого спектра действия (цикloserин, линкомицин, бензилпенициллин, клиндамицин). В некоторых случаях могут быть предпочтительнее, так как не подавляют нормальную микрофлору.

*По химическому строению* антибиотики делятся:

- на бета-лактамы антибиотики;
- аминогликозиды;
- тетрациклины;
- макролиды;
- линкозамиды;
- гликопептиды;
- полипептиды;
- полиены;
- антрациклиновые антибиотики.

*По механизму антимикробного действия* антибиотики можно разделить на следующие группы:

- ингибиторы синтеза клеточной стенки (мурамина);
- вызывающие повреждение цитоплазматической мембраны;
- подавляющие белковый синтез;
- ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот.

**Фитонциды** – образуемые растениями биологически активные вещества, убивающие или подавляющие рост и развитие бактерий, микро-скопических грибов, простейших (рис. 18).

Термин был предложен Б. П. Токиным в 1928 году.

Фитонцидами называют все секретируемые растениями фракции летучих веществ, в том числе те, которые практически невозможно собрать в заметных количествах. Эти фитонциды называют также нативными антимикробными веществами растений. Химическая природа фитонцидов существенна для их функции, но в термине «фитонциды» в явном виде не указывается. Это может быть комплекс соединений, например, терпеноидов, или так называемых вторичных метаболитов. Характерными представителями фитонцидов являются эфирные масла, извлекаемые из растительного сырья промышленными методами.

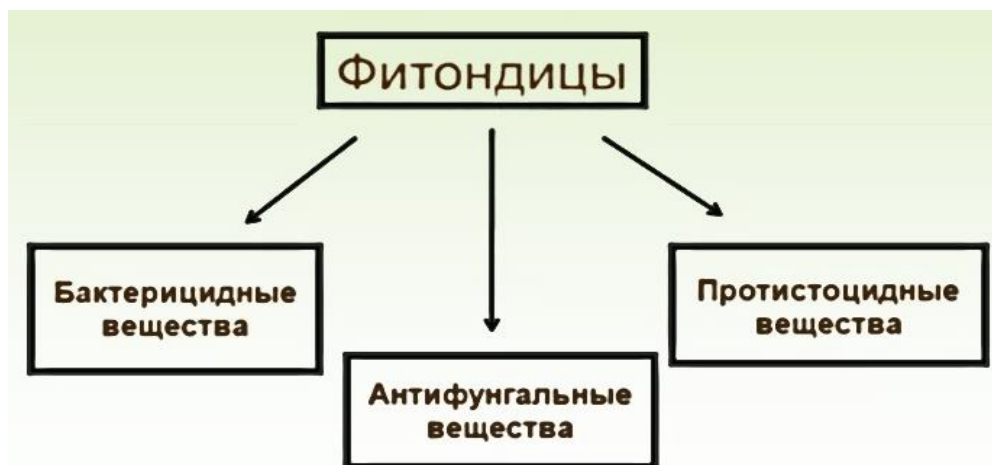


Рис. 18. Действие фитонцидов

Нативные фитонциды играют важную роль в иммунитете растений и во взаимоотношениях организмов в биогеоценозах. Выделение ряда фитонцидов усиливается при повреждении растений. Летучие фитонциды (ЛФВ) способны оказывать свое действие на расстоянии, например фитонциды листьев дуба, эвкалипта, сосны и многих других. Сила и спектр антимикробного действия фитонцидов весьма разнообразны. Фитонциды чеснока, лука, хрена, красного перца убивают многие виды простейших, бактерий и низших грибов в первые минуты и даже секунды. Летучие фитонциды уничтожают простейших (инфузорий), многих насекомых за короткое время (часы или минуты).

Фитонциды – один из факторов естественного иммунитета растений (растения стерилизуют себя продуктами своей жизнедеятельности).

Так, фитонциды пихты убивают коклюшную палочку (возбудителя дизентерии и брюшного тифа); сосновые фитонциды губительны для палочки Коха (возбудителя туберкулеза) и для кишечной палочки; береза и тополь поражают микроб золотистого стафилококка.

Фитонциды черемухи так сильны, что пагубно действуют не только на плесневые грибки, бактерии и вирусы, но и убивают мух, комаров, слепней.

В воздушной среде закрытых помещений содержится большое количество разнообразных микроорганизмов, среди которых встречаются как безвредные, так и патогенные виды, которые могут негативно влиять на состояние здоровья людей.

Фитонциды – вещества растительного происхождения, обладающие бактерицидным и фунгицидным действием.

Из чеснока выделен антибиотик аллицин. Он подавляет бактерии в концентрации 1:250 000. Аллицин образуется из содержащейся в чесноке аминокислоты аллиина.

Из тюльпана выделены два соединения – тулипозид А(1) и тулипозид В(2), обладающие антибиотическим действием.

Листья желтой акации, дуба, ольхи, смородины и ряда других растений выделяют гексен-2-аль ( $\text{CH}_3\text{—}(\text{CH}_2)_2\text{—CH=CH—CHO}$ ), который в малых концентрациях убивает простейших.

Из лишайника исландский мох выделен антибиотик, получивший название усниновой кислоты, которая угнетает рост туберкулезных бактерий.

Хлорогеновая кислота, по-видимому, играет роль в создании устойчивости картофеля к фитофторе.

Устойчивость моркови к ряду повреждающих ее грибов также связана с наличием в ее тканях бензойной, оксibenзойной, кофейной и хлорогеновой кислот.

В растениях кукурузы и пшеницы найдено вещество, которое угнетает развитие ряда бактерий, грибов и насекомых, повреждающих эти растения. Этот фитонцид представляет собой 6-метоксибензоксазоли-нон.

Для обеззараживания воздушной среды используются физические и химические методы. Наиболее безопасным и доступным методом очистки воздуха является применение фитонцидов растений и эфирных масел, которые одновременно могут благотворно влиять на самочувствие человека. Отсутствие аллергических реакций позволяет рекомендовать этот метод даже детям с аллергическими реакциями.

Механизм действия летучих фитонцидов заключается в том, что они вызывают разнообразные изменения микробной клетки: подавляют дыхание, растворяют и разрушают поверхностные слои и составные части протоплазмы (ферменты и др.). Очень важно, что микробы при длительном контакте с летучими выделениями растений не вырабатывали к ним устойчивости.

Защитная роль фитонцидов проявляется не только в уничтожении микроорганизмов, но и в подавлении их размножения, в отрицательном хемотаксисе подвижных форм микроорганизмов, в стимулировании жизнедеятельности микроорганизмов, являющихся антагонистами патогенных форм для данного растения, в отпугивании насекомых и т. п. Гектар соснового бора выделяет в атмосферу около 5 кг летучих фитонцидов в сутки, можжевелового леса – около 30 кг в сутки, снижая количество микрофлоры в воздухе. Поэтому в хвойных лесах (особенно в молодом сосновом бору) воздух практически стерилен (содержит лишь 200–300 бактериальных клеток на 1 м<sup>3</sup>), что представляет большой интерес для гигиенистов, специалистов по озеленению и др.

В медицинской практике применяют препараты лука, чеснока, хрена, зверобоя пронзеннолистного (препарат иманин) и других растений,

содержащих фитонциды, для лечения гнойных ран, трофических язв, трихомонадного кольпита. Фитонциды ряда других растений стимулируют двигательную и секреторную активность желудочно-кишечного тракта, сердечную деятельность.

#### **Порядок выполнения работы.**

**Определение отношения микроорганизмов к температуре.** На специальной для данного вида бактерий среде устанавливают минимум, оптимум и максимум температуры для роста и развития микроорганизмов. Для этого засевают в ряд чашек Петри с питательной средой исследуемую культуру микробов. Чашки помещают в термостат для культивирования при различных температурах: 20–25, 25–30, 30–37, 37–43 °С. После застывания среды на ее поверхности с помощью шпателя равномерно засевают исследуемую культуру микроорганизмов. Ведут наблюдения за интенсивностью роста и развития микробов при различных температурах.

**Методика определения устойчивости спор бактерий к высоким температурам.** Из спорообразующей культуры готовят обильную суспензию спор в стерильном физиологическом растворе. Вносят 1 мл суспензии спор в пробирки с 9 мл стерильного физиологического раствора и выдерживают в кипящей водяной бане различное время: 5, 10, 20, 30, 45 мин. Делают посевы на питательные среды из прогретых пробирок. Помещают в термостат для культивирования при температуре 37 °С на 72 ч. Наблюдают за интенсивностью роста и развития спорообразующих бактерий, определяют устойчивость спор к температуре.

**Определение отношения микроорганизмов к наличию кислорода.** Для определения отношения бактерий к кислороду делают посевы в агаризованную среду с глюкозой. Посевной материал помещают в чашки Петри, заливают расплавленным и охлажденным до температуры 40–45 °С агаром. Равномерно распределяют и дают застыть. Чашки переворачивают вверх дном и помещают в термостат при температуре 37 °С на 72 ч.

Просматривают и анализируют характер роста микроорганизмов. Аэробы растут на поверхности и самом верхнем слое среды. Факультативные анаэробы развиваются по всей среде, строгие – только в глубине среды.

**Методика определения отношения микроорганизмов к рН.** Микроорганизмы проявляют свою жизненную активность в границах определенной кислотности среды.

Делают посевы исследуемой бактериальной культуры на мясо-пептонный агар с различной кислотностью среды (рН): 3; 4; 5; 7; 8; 9. Чашки с посевами помещают в термостат при температуре 37 °С на 72 ч. Ведут наблюдения за интенсивностью роста и развития микроорганизмов на средах с различными показателями рН. Определяют оптимальные показатели кислотности среды для исследуемой культуры бактерий.

**Определение влияния растворов щелочи, кислоты и хлорной извести на микроорганизмы.** В стерильные чашки Петри заливают по 12 мл расплавленного мясо-пептонного агара и помещают на 15–20 мин в термостат для подсушивания. Дно чашек маркируют восковым карандашом.

Последовательно в чашки с посевами вносят стерильной глазной пипеткой по 1–2 капли раствора щелочи, кислоты, хлорной извести.

Чашки для инкубации микроорганизмов помещают в термостат при температуре 35 °С на 24–48 ч. Определяют влияние химических веществ (растворов щелочи, кислоты и хлорной извести) на рост и развитие микроорганизмов.

Если на изучаемую культуру микробов химическое вещество не действует, то не будет наблюдаться зоны прерывания или задержки роста. Результаты описывают и зарисовывают в тетради.

**Определение антагонизма между гнилостной и молочнокислой микрофлорой.** На мясо-пептонном агаре в чашке Петри бактериологической петлей делают два зигзагообразных посева: один – из пробирки с культурой аммонификаторов, другой – из культуры молочнокислых микроорганизмов. Чашку с посевами помещают в термостат при температуре 35–37 °С на 72 ч.

Наблюдают за характером роста и отмечают антагонизм между гнилостными и молочнокислыми микроорганизмами. Зарисовывают в тетради.

**Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.** Исследование проводят с использованием бумажных дисков, пропитанных растворами антибиотиков, приготовленных из расчета 1 единица антибиотика в 1 мл раствора. Высушенные диски (диаметром 1 см) хранятся пачками. В стерильную чашку Петри заливают 15–20 мл расплавленного мясо-пептонного агара. После того как среда застынет, на ее поверхность с помощью штапеля равномерно засевают культуру микроорганизма. Чашку помещают в термостат на 15–20 мин для подсушивания. Дно чашки маркером делят на секторы и маркируют. Стерильным пинцетом в каждый сектор накладывают диски, пропитанные тем или иным антибиотиком.

Чашку с посевами помещают в термостат на 24–48 ч при температуре 37 °С, после чего производят учет действия антибиотиков по величине зон задержки роста вокруг дисков. Результат описывают и зарисовывают в тетради.

В том случае, если на изучаемый микроорганизм антибиотик не действует, зоны задержки роста не будет. Чем сильнее действие антибиотика на микроорганизм, тем шире будет зона задержки (рис. 19).

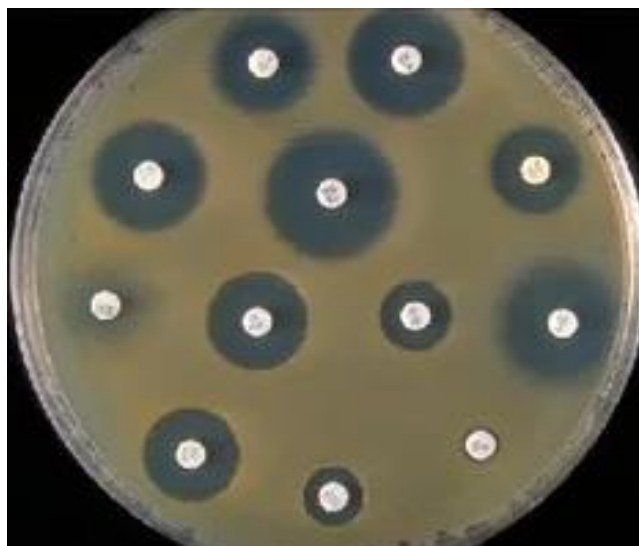


Рис. 19. Диско-диффузионный метод определения чувствительности бактерий к антибиотикам

**Определение чувствительности микроорганизмов к фитонцидам лука, чеснока и хвойных растений.** Исследование проводят с использованием свеженарезанных долек лука и чеснока, перетертой еловой, сосновой или можжевельной хвои. В стерильную чашку Петри заливают 15–20 мл расплавленного мясо-пептонного агара. Дно чашки перманентным маркером делят на секторы и маркируют. В каждый сектор на поверхность среды делают посев разных культур микроорганизмов. Чашку помещают в термостат на 15–20 мин для подсушивания. Стерильным пинцетом в центр чашки помещают несколько долек лука или чеснока или же немного перетертой хвои.

Чашку с посевами помещают в термостат на 24–48 ч при температуре 37 °С, после чего производят учет действия фитонцидов на разные виды микроорганизмов. Результат описывают и зарисовывают в тетради.

Чем сильнее действие фитонцида на микроорганизм, тем меньше будет проросших колоний или они вообще будут отсутствовать.

### Контрольные вопросы

1. Влияние физических факторов на микроорганизмы.
2. Влияние химических факторов на рост и развитие микроорганизмов.
3. Взаимоотношение микроорганизмов.
4. Классификация антибиотиков.
5. Влияние антибиотиков на микроорганизмы.
6. Отношение микроорганизмов к наличию кислорода.
7. Влияние кислотности среды на бактериальные клетки.
8. Отношение микроорганизмов к температуре.
9. Влияние фитонцидов на микроорганизмы.

### МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ К МОДУЛЮ № 2

### Тема 10. Методы лабораторной диагностики бактериальных

## и вирусных инфекций

**Цель занятия:** ознакомиться с методами лабораторной диагностики бактериальных и вирусных инфекций.

**Материалы и оборудование:** микроскопы; иммерсионное масло; окрашенные мазки сибирской язвы; мазки с рожистой палочкой; мазки с туберкулезной палочкой; культура кишечной палочки на среде Эндо; предметные стекла; набор реактивов для окрашивания по Граму; горелки; бактериологические петли; демонстрационные таблицы.

**Задание 1.** Изучить морфологические, культуральные и биохимические свойства возбудителей бактериальных и вирусных инфекций.

**Задание 2.** Микроскопировать готовые препараты-мазки возбудителей инфекционных болезней. Микроскопическую картину зарисовать в тетради.

**Бактериальная или вирусная инфекция** – это сложный биологический процесс взаимодействия макроорганизма и возбудителя болезни, происходящий при определенных условиях внешней среды.

В процессе эволюции одни виды микроорганизмов приспособились к паразитированию в организме только млекопитающих, другие – только в организме человека или рыб.

Действие патогенных микробов на организм высокоспецифичное, т. е. каждый вид их вызывает определенный инфекционный процесс. Степень патогенности (вирулентность) у разных штаммов одного и того же вида может быть различной.

*Источниками возбудителей инфекций* являются:

1) *зараженный организм* (рыба, животное, человек);

2) *растительные субстраты* (солома, сено, фураж, пораженные возбудителями ботулизма, фузариотоксикоза), в которых находятся возбудители инфекционных болезней, выделяющие токсины и вызывающие тяжелые отравления животных;

3) *навоз*. При неправильном хранении и использовании его инфицируется почва, вода, корма.

В водоемах содержится большое количество патогенных микробов, попадающих со сточными водами, при водопое больных животных. В озерах, прудах, сильно загрязненных органическими отбросами, активно размножаются эшерихии, лептоспиры, сальмонеллы.

При диагностике бактериальной или вирусной инфекции устанавливают диагноз, выясняют пути передачи инфекции, определяют факторы, способствующие распространению инфекции среди животных.

*Для диагностики бактериальных инфекций* применяют следующие лабораторные методы:

1. **Микроскопический метод.** Из патологического материала готовят мазки. Окрашивают и рассматривают под микроскопом. Мазки могут быть нативными, фиксированными и окрашенными.

2. **Микробиологический метод** основан на выделении чистой культуры возбудителя из патологического материала и ее идентификации. Выделение проводят путем его посева на соответствующие питательные среды.

Идентификацию чистых культур проводят по морфологическим, культуральным, биохимическим, антигенным, токсигенным и другим признакам.

Микроорганизмы способны продуцировать ядовитые вещества – токсины. Различают экзотоксины и эндотоксины.

*Экзотоксины* – это продукты метаболизма микробов, выделяемые в окружающую среду, а также сильные яды, обладающие антигенными свойствами и оказывающие специфические действия.

*Эндотоксины* – это яды, прочно связанные с микробными клетками, которые освобождаются лишь при разрушении микробов.

**3. Серологический метод** направлен на обнаружение антител в сыворотке больного (серодиагностика) и на выявление антигенов возбудителей (сероидентификация) непосредственно в исследуемом материале.

Для серодиагностики и сероидентификации применяются различные высокочувствительные иммунологические реакции: агглютинации, РНГА, РСК, преципитации, иммунофлюоресценции, иммуноферментный, радиоиммунный анализ.

При серодиагностике в качестве антигенов используют живые культуры микроорганизмов или диагностикумы – убитые взвеси микроорганизмов или экстракты из них, полученные химическим путем.

Для сероидентификации возбудителей применяют диагностические сыворотки с высоким содержанием антител и выраженной специфичностью.

**4. Биологический метод** сводится к искусственному заражению животных для воспроизведения экспериментальной инфекции и подтверждения предполагаемого диагноза.

Экспериментальное заражение лабораторных животных проводят с целью выделения чистой культуры возбудителя болезни, испытания патогенности изучаемого микроорганизма, определения эффективности вакцин, иммунных сывороток.

**5. Аллергический метод** основан на выявлении повышенной чувствительности организма к специфическому аллергену, которым является возбудитель заболевания. Для выявления такой чувствительности ставят кожно-аллергические пробы. Человеку, у которого предполагают наличие заболевания, сопровождающегося аллергией (туберкулез, бруцеллез, туляремия, сап, сибирская язва и др.), вводят внутрикожно малые количества аллергена из возбудителя данной инфекции (убитые микробные клетки, или извлеченные из них антигенные комплексы, или продукты жизнедеятельности возбудителя). При наличии инфекционной аллергии через 24–72 ч возникает воспалительная реакция в виде гиперемии, инфильтрата, отека кожи. В основе положительной кожной реакции лежит клеточная реакция ГЗТ, которая отражает специфическую повышенную чувствительность организма к инфекционному аллергену. Она возникает в результате текущего, перенесенного заболевания, вакцинации или инфицирования организма.

Кроме кожно-аллергических проб используются методы аллергодиагностики *in vitro* (реакции лейкоцитоллиза, торможения миграции лейкоцитов), позволяющие оценить состояние специфической сенсибилизации лейкоцитов крови в отношении определенного антигена.

6. В последнее время используется **новая группа методов – молекулярно-генетические**. Они применяются для идентификации некоторых прихотливых бактерий (легионелл, хламидий), а также гонококков, микобактерий и др. Эти методы основаны на идентификации ДНК. К ним относятся:

а) метод гибридизации нуклеиновых кислот – основан на способности ДНК (и РНК) специфически соединяться (гибридизироваться) с комплементарными фрагментами искусственно созданных нитей ДНК (и РНК), меченных изотопами или ферментами (пероксидазой или щелочной фосфатазой). В дальнейшем образцы исследуют различными методами (например, ИФА);

б) полимеразная цепная реакция (ПЦР) – основана на многократном образовании копий определенного участка ДНК с получением большого количества изучаемого фрагмента ДНК даже в том случае, если в распоряжении имелась всего одна исходная молекула геномной ДНК. Идентификацию копий ДНК проводят методом электрофореза.

*Лабораторные методы диагностики вирусных инфекций:*

1) заражение куриных эмбрионов;

2) исследование того патологического материала, в котором вирус оставляет свои следы. Например, бешенство – возбудитель нейротропный вирус. В лабораторию посылают голову животного, проводят микроскопию мозга на наличие телец Бабеша – Негри. Инфекционный гепатит – возбудитель вируса из семейства аденовирусов. Проводят исследование печеночных клеток на наличие включений типа Рубарта;

3) серологический;

4) биологический (биопроба).

**Порядок выполнения работы.**

По таблицам, рисункам ознакомиться и изучить основные свойства возбудителей бактериальных и вирусных инфекций. Изучить по мазкам морфологию, особенности строения каждого микроорганизма – возбудителя инфекционной болезни. Сделать необходимые записи в тетради.

### **Контрольные вопросы**

1. Инфекция. Инфекционный процесс.
2. Инфекционное заболевание.
3. Источники возбудителей бактериальных и вирусных инфекций.
4. Лабораторные методы диагностики бактериальных инфекций.
5. Лабораторные методы диагностики вирусных инфекций.

### **Т е м а 11. Изучение микрофлоры тела рыб и ракообразных**

**Цель занятия:** изучить микробиоту тела рыб и ракообразных микробиологическим и микроскопическим методами исследований.

**Материалы и оборудование:** смывы с поверхности кожи рыб, жаберных пластинок; чашки Петри; МПА; стерильные пипетки; предметные стекла; бактериологические петли; набор реактивов для окрашивания микроорганизмов по Граму; микроскопы; термостат; горелки; физиологический раствор.

**Задание 1.** Сделать посе́вы проб смывов с кожи рыб и ракообразных, жаберных пластинок и изучить культуральные свойства выросших микроорганизмов.

**Задание 2.** Приготовить препараты-мазки из смывов, а также из выросших колоний. Окрасить сложным методом по Граму.

**Задание 3.** Изучить морфологические особенности микроорганизмов с учетом их культуральных свойств. Определить вид микроорганизмов. Выполнить соответствующие записи и зарисовки в тетради.

Местом обитания различных видов микроорганизмов может быть организм рыбы и ракообразных.

Микрофлора тела рыб и ракообразных непостоянна, ее состав зависит от условий жизни и окружающей среды (типа рыбоводных водоемов, состава воды, иловых отложений, кормления и выделений). Нормальной микробиотой тела здоровых рыб и ракообразных являются шаровидные формы: стрептококки, диплококки, стафилококки, сарцины. Место их обитания – слизь, жабры. При повреждении кожных покровов они вызывают абсцессы, фурункулы. Из палочковидных форм обнаруживают кишечную палочку, синегнойную бактерию, сенную бациллу. Встречаются спорообразующие микробы, а также плесневые и лучистые грибы.

Прежде чем приступить к посевам, из внутренних органов берут материал для микробиологического исследования, из пораженных участков кожи – слизь, язвы, абсцессы и т. д.

Стерильным скальпелем делают соскоб с поверхности тела рыб и раков, полученный материал помещают на твердые питательные среды и растирают шпателем. Одновременно или после окончания посевов делают мазки из слизи поверхности тела, пораженных участков жабр, а также мазки-отпечатки из внутренних органов, окрашивая их метиленовой синью Леффлера, по Граму и т. д.

Посевы выдерживают в термостате при температуре 20–25 °С в течение 24–48 ч.

При подозрении в заболевании рыб микозами проводят микологические исследования.

При бранхиомикозе (жаберной гнили) исследуют под микроскопом некротизированные, подвергшиеся гнилоственному распаду участки жабр больных рыб. Лепестки жабр помещают на предметное стекло в каплю воды, разрывают препаровальной иглой и рассматривают при малом увеличении. В исследуемом материале обнаруживают гифы гриба со спорами.

#### **Порядок выполнения работы.**

Приготовить микроскопические препараты из смывов с кожи тела рыб и ракообразных, жаберных пластинок.

1. Зажигают газовую горелку.
2. Обеззараживают предметные стекла при помощи корковой пробки или сухого мыла с последующим протиранием чистой салфеткой.
3. Прокаливают бактериологическую петлю до покраснения над пламенем горелки.

4. Над пламенем горелки открывают пробирку с культурой и внутрь вводят петлю, охлаждают.

5. Соприкасаются петлей с культурой. При этом должно образоваться «зеркало».

6. Культуру тонким слоем распределяют на поверхности предметного стекла.

7. Фиксируют мазок над пламенем горелки.

8. С обратной стороны восковым карандашом обозначают место приготовления препарата (диаметр 1,5–2,0 см) и подписывают.

9. Окрашивают сложным методом по Граму.

10. Препараты микроскопируют.

При микроскопическом исследовании препаратов из смывов с кожи тела рыб и ракообразных, жаберных пластинок изучают форму микробов, размер, взаимное расположение, наличие спор и капсул, отношение к окраске по Граму. Микроскопическую картину зарисовывают в тетради.

Для получения культуры микроорганизмов делают посеы смывов с кожи рыб и ракообразных, жаберных пластинок в чашки Петри на стерильные питательные среды.

Для равномерного распределения микроорганизмов пробирку с исследуемой культурой осторожно, чтобы не смочить пробку, встряхивают или, зажав между ладонями, вращают в одну, а затем в другую сторону. Все манипуляции, связанные со взятием и посевом материала, производят над пламенем горелки в радиусе 20–30 см. Пробирку со смывами держат в левой руке, а бактериологическую петлю – в правой. Петлю обеззараживают над пламенем горелки. Пробку прижимают мизинцем правой руки к ладони и после извлечения держат в руке. Петлю вводят в пробирку с культурой. При взятии культуры на петле образуется тонкая прозрачная пленка – «зеркало». Чашку Петри с агаровой средой, заранее подписанную, приоткрывают под углом во избежание попадания микробов извне. Бактериологическую петлю кладут плашмя на питательную среду, чтобы не поцарапать ее поверхность, и материал распределяют зигзагообразно. Чашки Петри переворачивают вверх дном, во избежание размыва выросших колоний конденсационной водой, и ставят в термостат для культивирования при температуре 37 °С на 72 ч.

После выращивания микроорганизмов в термостате описывают культуральные свойства с целью их дифференциации. При этом учитывают размеры, форму, края, рельеф, прозрачность, консистенцию и цвет колоний.

Из выросших колоний готовят *препараты-мазки*.

1. Зажигают газовую горелку.

2. Обеззараживают предметное стекло при помощи корковой пробки или сухого мыла с последующим протиранием чистой салфеткой.

3. На поверхность предметного стекла наносят каплю стерильного физиологического раствора или стерильной воды.

4. Прокаливают бактериологическую петлю до покраснения над верхней частью пламени горелки.

5. Открывают чашку Петри и внутрь вводят охлажденную петлю.

6. Соприкасаются петлей с колонией микроорганизмов.

7. Культуру тонким слоем распределяют в капле стерильной воды на поверхности предметного стекла.
8. Фиксируют мазок над пламенем горелки.
9. Обозначают место приготовления препарата и подписывают его с обратной стороны.
10. Окрашивают сложным методом по Граму.
11. Микроскопируют, анализируют морфологические особенности.
12. Микроскопическую картину зарисовывают в тетради.

### **Контрольные вопросы**

1. Методы изучения микробиоты тела рыб и ракообразных.
2. Как готовят препараты-мазки из смывов с кожи рыб и ракообразных, жаберных пластинок?
3. Как делают посевы из смывов?
4. Как готовят препараты-мазки из выросших колоний?
5. Нормальная микробиота тела рыб и ракообразных.

### **Тема 12. Характеристика возбудителей инфекционных болезней и микозов у рыб и ракообразных**

**Цель занятия:** изучить морфологические, физиологические, культуральные и другие свойства возбудителей инфекционных болезней и микозов у рыб и ракообразных.

**Материалы и оборудование:** окрашенные мазки микробов-возбудителей (краснухи, флюоресценцевого некроза, вибриоза, фурункулеза, септицемии, чумы, оспы, болезни плавательного пузыря, афаномикоза, пятнистой болезни); окрашенные препараты возбудителей микозов (бранхиомикоза, нефромикоза, дерматомикоза); микроскопы; демонстрационные материалы.

**Задание 1.** Изучить морфологические свойства возбудителей инфекционных болезней и микозов у рыб и ракообразных методом микроскопии окрашенных препаратов.

**Задание 2.** Изучить культуральные свойства возбудителей инфекционных болезней и микозов рыб и ракообразных.

**Задание 3.** Зарисовать микроскопическую картину в тетради.

#### **Вирусная геморрагическая септицемия.**

Вирусная геморрагическая септицемия радужной форели – контагиозная заразная болезнь радужной форели и некоторых других лососевых рыб (рис. 20).

Возбудитель болезни – фильтрующийся вирус. Это РНК-содержащий вирус пальцевидной формы, его длина равна 180–200 нм, ширина – 60–75 нм. Внутри вируса находится ядро диаметром 20 нм, заключенное в ребристую оболочку, покрытую сверху еще гладкой пленкой.

Вирус чувствителен к эфиру и глицерину, а также к колебаниям рН. Он хорошо культивируется в перевариваемых клеточных культурах, полученных

из фибробластов яичников радужной форели. Цитоплазматический эффект под действием этого вируса при температуре 20–22 °С проявляется через 1–3 суток, при этом клетки приобретают округлую форму.

В погибших форелях, сохраняемых во льду, вирус исчезает в течение 24 суток. При температуре –20 °С и ниже он сохраняется более двух лет. Источником инфекции является больная рыба, ее выделения, трупы погибших форелей. Заражение происходит через ложе и воду прудов. Передача инфекции происходит путем прямого контакта здоровой и больной рыбы, с водой, инвентарем, а также с беспозвоночными животными – носителями инфекции.

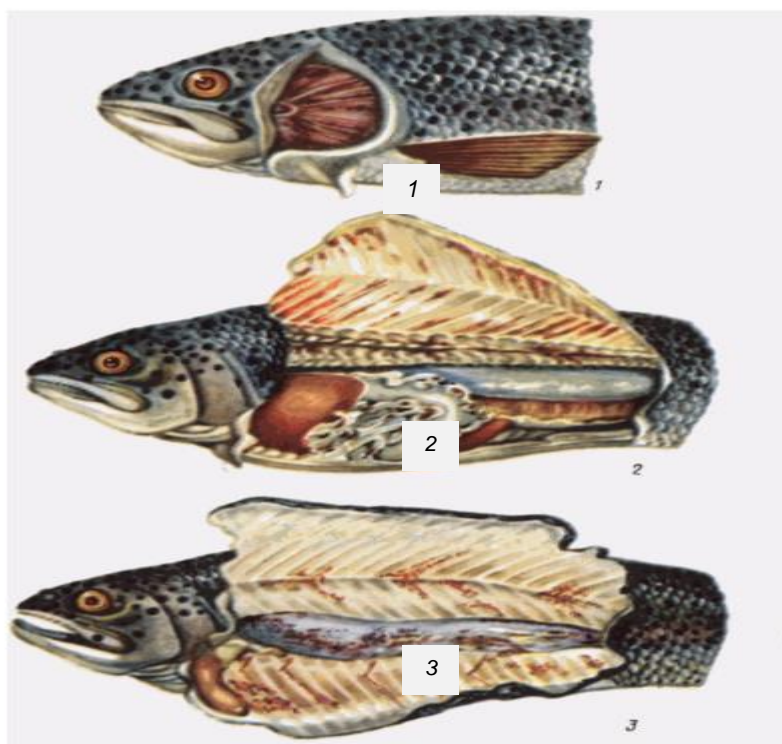


Рис. 20. Вирусная геморрагическая септицемия форели:  
1 – анемия и кровоизлияния в жабрах;  
2 – геморрагии в мышцах и висцеральной жировой ткани;  
3 – множественные геморрагии в мускулатуре, плавательном пузыре

Инкубационный период при естественной инфекции и температуре воды до 15–16 °С обычно равен 7–15 дням, редко 25 дням.

#### **Аэромоноз (краснуха).**

Аэромоноз – остропротекающая болезнь, поражает в основном карпов, сазанов и их гибридов. Реже краснухой болеют серебряные и золотые караси.

**Эта болезнь вызывает геморрагическое воспаление кожного покрова, сопровождающееся образованием язв, а также поражение внутренних органов и водянку брюшной полости (рис. 21).**



Рис. 21. Аэромоноз

Аэромоноз вызывается вирулентными штаммами бактерии *Aeromonas punctata*.

Бактерия *A. punctata* хорошо размножается на обычных мясо-пептонных средах при температуре 20–25 °С в аэробных и анаэробных условиях. Некоторые штаммы способны расти на питательных средах также при температуре 37 °С.

В молодых культурах бактерия короткая, с закругленными концами, кокковидная, подвижная палочка, лежит изолированно или парами. Ее ширина равна 0,5–0,8 мкм, длина – 1,2–1,8 мкм. По Граму бактерия не окрашивается, спор и капсул не образует. При росте в мясо-пептонном бульоне возникает равномерное помутнение, образует хлопьевидный, беловато-серый осадок на дне. На поверхности среды развивается пленка. При суточном культивировании посевов на МПА вырастают круглые колонии, с ровными краями, выпуклые, блестящие, полупрозрачные с голубоватым или беловато-матовым оттенком, диаметром 2–3 мм. На косом агаре бактерии хорошо растут по штриху, мутят конденсационную воду, пигмент не образуют. При росте на среде Китта – Тароцци происходит интенсивное помутнение среды с выделением пузырьков газа.

При посеве в столбик мясо-пептонного желатина на 3–5-е сутки происходит разжижение среды воронкой. Лакмусовое молоко краснеет, свертывается и пептонизируется. На картофеле на 3–5-е сутки появляется желтоватый налет, приобретающий со временем кремовый цвет, крахмал гидролизует.

Углеводы (глюкоза, манноза, сахароза, мальтоза, маннит) бактерии ферментируют с образованием кислоты и газа, лактозу и дульцит не изменяют. Нитраты восстанавливают до нитритов. Бактерия расщепляет перекись водорода, редуцирует метиленовую синь.

Источником инфекции служат больные рыбы и их выделения, рыбы-микробоносители, а также трупы погибших от краснухи рыб.

Инфекционное начало проникает в организм здоровых рыб через поврежденную кожу и жабры, а также через пищеварительный тракт вместе с инфицированной пищей и водой.

### **Вибриоз.**

Вибриоз угрей (чума угрей, вибрионная болезнь угрей) – острозаразная инфекционная болезнь, характеризующаяся поражением кожного покрова рыб, проявляющимся в покраснении и воспалении кожи, а также в последующем образовании на передней части тела и голове угрей сначала небольших бугорков или шишек, а затем открытых кровоточащих язв.

Возбудитель болезни – бактерия *Vibrio anguillarum* Bergmann (рис. 22). Она бобовидной формы. Длина ее равна 1,5 мкм, ширина – 0,5 мкм, на одном конце ее имеется жгутик. Вибрионы быстро двигаются, спор и капсул не образуют. По Граму не окрашиваются. На агаре вибрионы дают слизистый бесцветный налет. Желатин разжижают. Сбраживают глюкозу, лактозу и мальтозу с образованием кислоты, сахарозу и маннит не изменяют. Сероводород не выделяют, образуют индол. Хорошо растут на средах, содержащих 1,5–3,3 % хлористого натрия. При концентрации соли 0,05 %, а также в чистой проточной воде вибрионы погибают. Возбудитель болезни – факультативный анаэроб.

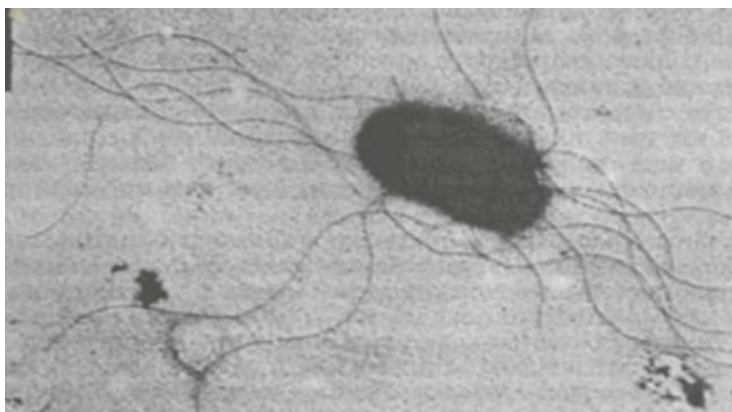


Рис. 22. Возбудитель вибриоза

### **Бранхиомикоз, или жаберная гниль.**

Бранхиомикоз – острозаразная болезнь рыб различных видов, характеризующаяся поражением кровеносных сосудов жаберного аппарата и некротическим распадом жаберной ткани (рис. 23).



Рис. 23. Бранхиомикоз

Возбудителем бранхиомикоза у карпа, сазана (и их гибридов), карася, пескаря является гриб *Branchiomyces saguinis* Plehn, а у щуки – *B. demigrans* Wundsch. У линя могут паразитировать оба гриба.

*Branchiomyces saguinis* (рис. 24) – специфический паразит крови. Гифы гриба сильно разветвлены, толщина их составляет 8–30 мкм, длина – 10–15 мкм. В вегетативном состоянии они обычно тоньше. При образовании спор утолщаются. Диаметр спор равен 5–9 мкм. Сильно разветвленные гифы гриба находятся только в кровеносных сосудах жаберных дуг, жаберных лепестков и дыхательных складок. В соединительной ткани рост гриба прекращается.



Рис. 24. Возбудитель бранхиомикоза

Хорошо растет на МПБ. Чистая культура в кровяном бульоне растет так же хорошо, как и в живой жаберной ткани рыб.

Мицелий гриба *Branchiomyces demigrans* состоит из древовидно-разветвленных гиф с толстой оболочкой, имеющей вид двойной мембраны толщиной от 0,5 до 0,7 мкм. Ширина гиф равна 13–15 мкм, в конечной стадии развития она увеличивается до 22–28 мкм. Первоначально гриб поселяется в капиллярах дыхательных складок, затем гифы проникают в вены и через разрывы их выходят в соединительную ткань жабр, где продолжают свой рост.

Возбудитель бранхиомикоза распространен в прудах и водоемах, находящихся в антисанитарном состоянии. Основным источником заражения служат больные рыбы, трупы погибших рыб, рыбы-паразитоносители.

#### **Сапролегниоз, или дерматомикоз.**

Сапролегниоз (дерматомикоз) – микозная, секундарная болезнь пресноводных рыб различных видов, характеризующаяся поражением кожи, плавников и жаберного аппарата условно-патогенными грибами (рис. 25).



Рис. 25. Сапролегниоз

Возбудители – низшие грибы (фикомицеты). Наиболее известны роды *Saprolegnia* (рис. 26) и *Achlia*, развивающиеся сапрофитно на трупах насекомых или паразитирующие на рыбьей икре и рыбах, вызывая нередко их эпизоотии и гибель. Грибы имеют разветвляющиеся и неразветвляющиеся гифы, лишенные перегородок. Разросшиеся гифы сплетаются и образуют мицелий гриба. Толщина гиф колеблется от 20 до 75 мкм. Гифы окружены оболочкой и заполнены протоплазмой, содержащей многочисленные ядра. Культуру выращивают на жидких и твердых средах. Гриб хорошо растет на кусочках вареной бараньей печени в стерильной воде. В природных условиях сапролегнии хорошо развиваются на трупах насекомых и их личинок, лягушек, головастиков и рыб.



Рис. 26. Гриб *Saprolegnia*

Сапролегниозом болеют прудовые рыбы всех возрастных групп. Распространению болезни способствуют голодание рыб, плохой газовый режим и солевой состав воды, травмирование рыбы в садках. Сапролегниоз является сопутствующей болезнью при фурункулезе лососевых, краснухе карпов, бронхиомикозе и других инфекционных болезнях.

### **Нефромикоз.**

Нефромикоз – инфекционная болезнь карпов и золотых карасей, характеризуется поражением почек (рис. 27) нитчатými грибами рода *Nephromyces* (рис. 28) и сопровождается массовой гибелью больных рыб.



Рис. 27. Пораженные почки при нефромикозе



Рис. 28. Гриб *Nephromyces*

Мицелий гриба сильно разветвляется, ширина гиф достигает 1,5–3,0 мкм. Гриб культивируют на желатиновой среде, приготовленной на рыбном бульоне. В желатиновых культурах через 2–3 дня от концов особых вертикальных ответвлений мицелия (конидиеносцев) отчлениваются эллипсоидные конидии размером 5–6×1,5–3,0 мкм, которые скапливаются в мелкие кучи. Конидии содержат по два мелких тельца.

Заражение происходит в водоемах, где в воде имеются и споры, длительно сохраняющиеся во внешней среде.

#### **Чума щук.**

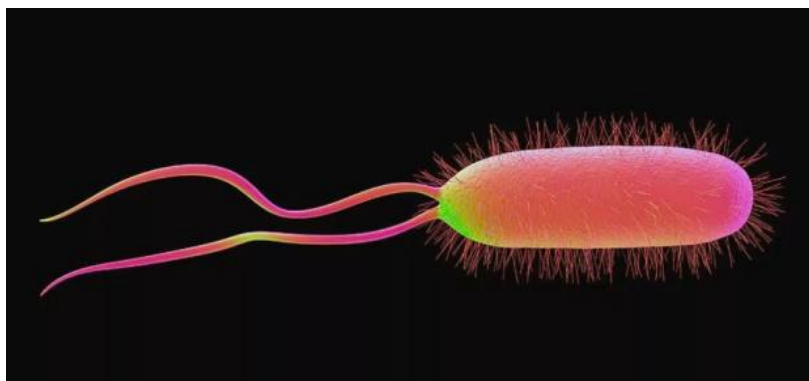
Чума – инфекционная болезнь щук и пресноводных рыб других видов, сопровождающаяся геморрагическим воспалением слизистой оболочки ротовой полости и кожного покрова или его некротическими язвенными воспалениями (рис. 29).



Рис. 29. Чума щук

Возбудителем болезни в пресноводных водоемах является бактерия *Pseudomonas punctata*, а в солоноватоводных – бактерия *Vibrio anguillarum*.

*Pseudomonas punctata* – подвижная палочка размером 0,5–3,0 мкм, имеет от 2 до 4 жгутиков, спор и капсул не образует, по Граму окрашивается отрицательно (рис. 30). Факультативный анаэроб. На косом агаре образует бесцветные, гладкие, блестящие колонии. Образует пигмент. При росте в бульоне наблюдают помутнение среды, образование пленки, хлопьевидного осадка. Желатин не разжижает. Углеводы (лактозу, сахарозу, маннит, мальтозу) бактерия не ферментирует. Глюкозу расщепляет с образованием



КИСЛОТЫ.

Рис. 30. Бактерия *Pseudomonas punctate*

*Vibrio anguillarum* – подвижный вибрион длиной 2,0 мкм, спор и капсул не образует (рис. 31).



Рис. 31. Вибрион *Vibrio anguillarum*

По Граму не окрашивается. При росте на косом агаре образует гладкие сухие колонии. При росте в бульоне появляются муть и толстая пленка (растет без повышения солености). Свертывает лакмусовое молоко, желатин разжижает. Глюкозу, лактозу, маннит, сахарозу ферментирует с образованием кислоты. Мальтозу не разлагает. Образует сероводород. Факультативный анаэроб.

Источником инфекции являются больные рыбы, микробоносители, трупы погибших от этой болезни рыб. Заражение происходит через воду, поврежденные кожные покровы, слизистые оболочки.

**Порядок выполнения работы.**

Провести микроскопическое исследование окрашенных препаратов. Зарисовать обнаруженные формы микробов. Описать возбудителей инфекционных болезней и микозов рыб и ракообразных по форме: название, морфология, культуральные свойства, биохимические свойства, распространение.

### **Контрольные вопросы**

1. Инфекция. Источники и факторы передачи инфекции.
2. Динамика инфекционного процесса.
3. Пути внедрения, распространения и выделения микроорганизмов из организма рыб и ракообразных.
4. Морфология и физиология возбудителей бактериальных инфекций у рыб и ракообразных.
5. Морфология и физиология возбудителей вирусных инфекций.
6. Характеристика возбудителей микозов у рыб и ракообразных.

## **МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ К МОДУЛЮ № 3**

### **Т е м а 13. Микробиологические методы исследований воды рыбоводных водоемов**

**Цель занятия:** освоить микробиологические методы исследований воды рыбоводных водоемов.

**Материалы и оборудование:** пробы воды рыбоводных водоемов; стерильный физиологический раствор; пробирки; пипетки; чашки Петри; МПА, среда Эндо, среда Эйкмана; микроскопы; горелки; корковая пробка; предметные стекла; набор реактивов для окрашивания микроорганизмов по Граму; бактериологические петли; демонстрационный материал.

**Задание 1.** Определить видовое разнообразие микрофлоры воды рыбоводных водоемов методом пластинок обрастания.

**Задание 2.** Определить микробное число воды рыбоводных водоемов.

**Задание 3.** Определить коли-титр и коли-индекс воды.

**Задание 4.** Приготовить микроскопические препараты, окрасить их по Граму. Микроскопическую картину зарисовать в тетради.

Вода – естественная среда обитания различных микроорганизмов. Численность микробов в воде зависит от многих факторов: содержания органического вещества, расположения и степени загрязненности водоема, скорости течения воды, температуры окружающей среды, времени года и т. д.

В состав микрофлоры водоемов входят водоросли, простейшие, плесневые грибы, фаги и другие микроорганизмы.

Вода открытых водоемов играет значительную роль в возникновении, распространении многих инфекционных и грибковых болезней человека, животных, рыбы (сибирская язва, бруцеллез, сальмонеллез, лептоспироз, холера, вибриоз, дерматомикозы и т. д.).

В настоящее время для оценки качества воды используются различные показатели: органолептические, химические, бактериологические, биологические, гельминтологические и др.

**1. Органолептические показатели.** К органолептическим показателям, с помощью которых производится определение физических свойств воды, относятся: прозрачность, цветность, запах, вкус.

**Прозрачность** зависит от количества и состава находящихся в воде взвешенных частиц. Она может ухудшаться за счет попадания в водоемы фекально-хозяйственных и производственных сточных вод, а также дождевых и талых, которые несут с собой большое количество взвешенных частиц почвы с поверхности окружающей территории. Считают, что ухудшение прозрачности воды имеет существенное значение с эпидемиологической точки зрения, так как такая вода может стать причиной возникновения кишечных инфекций. Прозрачность воды определяется при помощи специального шрифта Снеллена, который читают через столб воды, налитой в цилиндр.

**Цвет** воды зависит часто от природных условий. Воды болотистого происхождения (особенно торфяных болот) имеют гамму оттенков от слабо-желтого до коричневого, что зависит от содержания в ней гуминовых веществ. Коллоидные соединения железа придают воде желтовато-зеленоватое окрашивание. Микрофлора и микрофауна, особенно водоросли в период цветения, придают воде ярко-зеленый, бурый и другие окраски. Самую разнообразную окраску вода приобретает в результате стока вод промышленных предприятий.

Цветность воды определяют колориметрически при помощи стандартной шкалы и выражают в градусах.

**Запах** воды может быть различным: болотный (при разложении растительных органических веществ); гнилостный (от разлагающихся нечистот и отходов); свежей травы, землистый, зловонный и др.

**Активная реакция воды рН** зависит от присутствия в ней ионов Н и ОН. Обычно она колеблется в пределах 6,8–8,5.

**2. Химические показатели.** К этой группе относятся различные химические вещества. Одни из них оказывают вредное влияние на организм человека, другие позволяют косвенно судить о загрязнении воды органическими веществами и тем самым определить степень эпидемиологической опасности воды. Среди веществ, указывающих на загрязнение воды органическими веществами, наибольшее значение имеет определение азотсодержащих веществ (аммиака, нитритов, нитратов).

**Аммиак** образуется в начальной стадии разложения попавших в воду веществ органического происхождения. Его наличие даже в виде следов

вызывает подозрение, что в воду попали свежие нечистоты человека и животных. И с этой точки зрения он является косвенным показателем, указывающим на заражение воды микробами. Вместе с тем его находят в болотистых, торфяных водах, а также в железистых грунтовых водах. Естественно, что в этом случае он не имеет санитарно-показательного значения.

**Нитриты** (соли азотистой кислоты) могут быть также различного происхождения. Дождевые воды почти всегда содержат азотистую кислоту в количестве 0,01–1,7 мг/л. Нитриты могут образоваться в результате восстановления нитратов денитрифицирующими бактериями, а также при нитрификации аммиака. В последнем случае они приобретают большое санитарно-показательное значение и их наличие указывает на то, что аммиак, образовавшийся в воде в результате разложения органических веществ, начал подвергаться минерализации. Следовательно, наличие нитритов в воде свидетельствует о недавнем загрязнении ее органическими веществами животного происхождения.

**Нитраты** (соли азотной кислоты) обнаруживаются в незагрязненных водах болотистого происхождения, но они могут оказаться в воде как продукт минерализации аммиака и нитритов, образовавшихся в результате гниения органических отходов. Наличие только нитратов при отсутствии нитритов и аммиака указывает на давнее, возможно случайное, однократное загрязнение воды фекалиями человека и животных. Если одновременно с нитратами в воде присутствуют аммиак и нитриты, это является серьезным признаком постоянного и длительного загрязнения воды. В связи с тем, что в настоящее время установлена роль нитратов воды в возникновении метгемоглобинемии, особенно у детей, этому показателю придается большое значение.

Практически азотсодержащие вещества определяются колориметрически при помощи фотоэлектроколориметров или методом объемной колориметрии.

**Хлориды** являются ценным санитарным показателем. Они всегда содержатся в моче и кухонных отбросах, а следовательно, если их находят в воде, возникает подозрение о загрязнении ее хозяйственно-бытовыми сточными водами. Однако они могут оказаться и в грунтовой воде, так как, фильтруясь через почву, содержащую хлористый натрий, она обогащается хлоридами. Хлориды определяются методом аргентометрического титрования.

Определенное значение при оценке качества воды играет **окисляемость** – показатель, характеризующий количество находящихся в воде легко окисляющихся органических веществ. Так как непосредственное определение в воде органических веществ является методически сложным, то об их наличии судят косвенно, по количеству кислорода, пошедшему на их окисление в 1 л воды. Следовательно, этот показатель дает общее, условное представление о количестве органических загрязнений. Практически окисляемость определяется методом перманганометрии.

**Жесткость** воды обуславливается наличием в ней растворимых солей кальция и магния. Различают: общую жесткость, зависящую от растворенных

солей угольной, соляной, азотной, серной и фосфорной кислот; устранимую (или карбонатную), обусловленную присутствием бикарбонатов, которые при кипячении выпадают в виде белого осадка; неустраняемую (или постоянную), зависящую от солей, не выпадающих в осадок при кипячении.

**3. Санитарно-бактериологические показатели качества воды.** Непосредственное обнаружение в воде возбудителей инфекционных заболеваний является затруднительным в виду того, что методы выделения патогенных микроорганизмов, особенно вирусов, сложны и не позволяют в короткий срок дать заключение об эпидемиологической характеристике воды.

Поэтому санитарно-бактериологическая оценка производится по косвенным показателям, которыми являются:

- 1) микробное число;
- 2) содержание кишечной палочки.

Оба эти показателя общеприняты на основе длительных наблюдений, свидетельствующих о том, что чем сильнее загрязнена вода, тем больше в ней сапрофитной и кишечной микрофлоры и, наоборот, чем меньше она загрязнена (особенно выделениями человека и хозяйственно-бытовыми сточными водами), тем меньше в этой воде число микробов и, в частности, кишечных палочек и, следовательно, тем слабее выражена возможность возникновения инфекционных заболеваний при употреблении такой воды.

**Микробное число** (общее количество микробов в 1 мл воды) является ориентировочным показателем, поскольку подсчитываются все находящиеся в пробе микробы без их идентификации; оно указывает на загрязнение воды любой сточной жидкостью, отбросами и т. д., которые не гарантированы от содержания в них патогенных бактерий.

Обнаружение кишечной палочки в воде имеет большое санитарно-показательное значение. Это связано с тем, что местом естественного обитания ее является толстый кишечник человека и животного. Во внешнюю среду она может попадать только с испражнениями. Следовательно, обнаружение кишечной палочки в воде свидетельствует о загрязнении ее фекалиями, в которых могут находиться, помимо *E. coli*, патогенные бактерии кишечной группы – возбудители брюшного тифа, дизентерии, паратифов. Кишечная палочка называется показателем фекального загрязнения воды.

Для того чтобы выяснить степень эпидемиологической опасности воды в отношении кишечных инфекций, необходимо установить интенсивность фекального загрязнения воды, т. е. определить количество кишечных палочек в воде, так как чем больше *E. coli* в воде, тем сильнее она загрязнена фекалиями. Количественно наличие кишечной палочки характеризуется двумя показателями:

- а) коли-титр – наименьшее количество воды (в миллилитрах), в котором содержится одна кишечная палочка;
- б) коли-индекс – количество кишечных палочек в 1 л воды.

В последние годы некоторые авторы предлагают использовать для санитарно-бактериологической оценки воды, помимо кишечной палочки, фекальный стрептококк, *Clostridium perfringens Welenii*, бактериофаг.

Разрабатывается метод обнаружения патогенных бактерий кишечной группы при помощи гаптена (неспецифического антигена) и др.

При исследовании воды водоисточников, особенно открытых водоемов, большое значение приобретают некоторые другие показатели и приемы.

Так, при исследовании воды в открытых водоемах большое значение имеет санитарно-топографическое обследование, задачей которого является обнаружение на площади водосбора, который питает водоем, факторов, могущих ухудшить качество воды. Изучается рельеф местности, состав почвы, наличие лесных массивов. Характеризуется размещение населенных пунктов, промышленных предприятий, сельскохозяйственное использование территории. Особое значение имеет изучение степени заселения территории, так как чем выше плотность населения, тем больше образуется отбросов органического происхождения и тем реальнее возможность попадания их в водоем и возникновения водных эпидемий. Необходимо получить сведения об использовании водоема в народнохозяйственных целях, обратив особое внимание на водный транспорт и рыбное хозяйство, на использование водоемов в спортивных целях, на заболеваемость населения данного района. Большое значение имеют гидрометрические измерения (глубина, скорость течения, расход воды и т. д.).

Существенную роль играет биологический анализ, так как известно, что в водоеме большие количества водных растений и животных влияют на качество воды. В силу этого водная флора и фауна используются в качестве показательных организмов, чувствительно реагирующих на изменение условий жизни водоема. Эти биологические организмы называются сапробными (*sapros* – гнилостный). Существуют четыре зоны сапробности (полисапробная,  $\alpha$ -мезосапробная,  $\beta$ -мезосапробная и олигосапробная). Каждой из них соответствует определенная флора и фауна, а также степень содержания кислорода в воде.

Для определения санитарного качества воды используют косвенные бактериологические показатели: микробное число, коли-титр, коли-индекс.

**Микробное число** – это количество колоний, выросших в чашках Петри из 1 мл воды поверхностных водоемов при температуре 37 °С в течение 24 ч. Микробное число воды открытых водоемов не должно превышать 300.

Кишечная палочка, будучи постоянным представителем нормальной микрофлоры кишечника человека, является показателем фекального загрязнения водоемов.

**Коли-титр** – это наименьший объем исследуемой воды, выраженный в миллилитрах, в котором обнаруживают одну кишечную палочку.

**Коли-индекс** – это количество кишечных палочек, содержащихся в 1 л воды. Вода открытых водоемов считается хорошей при значении коли-титра не менее 100, коли-индекса – не более 10.

Установив коли-титр исследуемой воды, можно пересчитать коли-индекс, и наоборот. Для перевода коли-титра в коли-индекс необходимо 1000 разделить на число, выражающее коли-титр.

Например: если коли-титр равен 25 мл, то коли-индекс будет равен:  $1000 : 25 = 40$ , т. е. в 1 л исследуемой воды содержится 40 кишечных палочек.

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

Например: если коли-индекс равен 250, то коли-титр будет равен:  $1000 : 250 = 4$  мл, т. е. одна кишечная палочка обнаружена в 4 мл исследуемой воды.

### **Правила отбора воды для микробиологических исследований.**

Пробы воды из открытых водоемов отбирают с помощью батометров, представляющих собой металлический каркас с грузилом, в который вставляют бутылку. Батометр погружают на заданную глубину и открывают бутылку, потягивая за веревку, привязанную к пробке. После наполнения ее (о чем свидетельствует прекращение появления пузырьков воздуха на поверхности воды) батометр извлекают и закрывают бутылку стерильной пробкой.

Пробы воды из открытых водоемов берут на глубине 10–25 см и на таком же расстоянии от дна при малой глубине водоема.

Для исследования необходимо от 200 мл до 1 л воды. Микробиологический анализ воды должен быть произведен не позднее 2 ч с момента ее взятия. Указанный срок может быть увеличен до 6 ч при условии хранения пробы воды при температуре от 1 до 5 °С в холодильнике.

К каждой пробе воды прилагают сопроводительную записку, в которой отмечают следующее:

- 1) наименование источника и место его нахождения;
- 2) дата отбора проб (год, месяц, число, час);
- 3) место взятия пробы (расстояние от берега и глубина);
- 4) температура воздуха, сведения об осадках в день взятия пробы и за последние 10 дней;
- 5) температура воды при отборе пробы;
- 6) краткие описания водоема;
- 7) цель микробиологического исследования;
- 8) должность и место службы лица, взявшего пробу, и его подпись.

При отсутствии батометра пробу воды берут в обычную бутылку, к которой прикрепляют грузило.

### **Порядок выполнения работы.**

**Метод пластинок обростания.** Помещение на определенный срок в естественную среду обитания микроорганизмов обезжиренных предметных стекол с последующим изучением их под микроскопом позволяет выявить формы микроорганизмов, не растущие на питательных средах, описать микробные пейзажи и проследить за формированием и развитием бактериальных биоценозов воды и донных отложений.

Перед погружением в воду водоемов предметные стекла должны быть промаркированы и тщательно вымыты. Их следует брать пинцетом или руками за шлифованные торцы. Брать стекла за плоскости нельзя, так как останутся отпечатки пальцев, на которых будет наблюдаться усиленное

развитие микроорганизмов. Время выдержки стекол должно быть таким, чтобы микроорганизмы успели прикрепиться и дать характерные микроколонии. Однако оно не должно быть продолжительным, так как будет наблюдаться вторичный рост микроорганизмов, что не соответствует условиям изучаемого водоема. Оптимальное время экспозиции стекол – 3 суток. По истечении этого времени стекла вынимают за торцы, обсушивают на воздухе.

Влажным ватным тампоном со стекол снимают обрастания, прикрепившиеся к их нижней поверхности.

Обрастания, находящиеся на верхней поверхности, фиксируются к стеклам так же, как обычные бактериологические мазки. Для этого стекла 3–4 раза нижней стороной проводят над горелкой.

Окрашивают пластинки обрастания сложным методом по Граму.

Изучают окрашенные пластинки обрастания под микроскопом. Препараты просматривают вначале бегло на малом увеличении, а затем детально, переходя от одного поля зрения к другому, под иммерсией. После тщательного изучения и описания микробных пейзажей основные фрагменты зарисовывают в тетради.

**Определение общей бактериальной загрязненности воды рыбоводных водоемов.** При микробиологическом исследовании воды из открытых водоемов делают разведения: 1 мл исследуемой воды стерильной пипеткой вносят в пробирку с 9 мл стерильной воды или стерильного физиологического раствора, тщательно перемешивают и получают первое разведение 1:10. Из пробирки с разведением 1:10 стерильной пипеткой берут 1 мл и переносят в следующую пробирку с 9 мл стерильной воды – получают второе разведение 1:100. Из пробирки с разведением 1:100 переносят 1 мл в следующую пробирку и получают разведение 1:1000 и т. д.

Для приготовления каждого разведения следует применять новую стерильную пипетку.

Из пробирок с разведениями берут по 1 мл и вносят в стерильные чашки Петри. Внесенную в чашку пробу заливают 10–12 мл расплавленного и остуженного до температуры 45 °С МПА. Чашку быстро закрывают и вращательными движениями по горизонтальной поверхности стола распределяют равномерно ее содержимое по всей площади чашки. На крышке чашки восковым карандашом делают надписи с указанием разведения, даты посева, фамилии студента. Чашки переворачивают вверх дном и ставят в термостат при температуре 37 °С на сутки.

После указанного срока культивирования приступают к подсчету колоний. Для этого чашку кладут вверх дном на темный лист бумаги, обеспечивая тем самым лучшую видимость. При небольшом количестве подсчитывают все выросшие колонии. Для удобства каждую подсчитанную колонию отмечают со стороны дна чашки карандашом или чернилами для стекла.

При обильном росте микробов дно чашки делят карандашом на сектора, подсчитывают число колоний отдельно в каждом секторе, а затем полученные

числа складывают и умножают на степень разведения воды. Аналогичным образом подсчитывают количество микробных клеток в других чашках. Умножают на степень разведения. Складывают количество микробов, инкубированных во всех чашках, и делят на число чашек. Получают среднее количество микроорганизмов в 1 мл воды водоема – микробное число.

**Определение коли-титра воды методом постановки бродильных проб.** Исследуемую воду в количестве 100 и 10 мл соответственно засевают на 10 и 1 мл концентрированной глюкозо-пептонной среды. Посевы воды в объемах 1 мл и меньше производят на 10 мл разведенной среды (первичная бродильная проба). Посевы помещают в термостат на 24 ч при температуре 43 °С.

Из колб, в которых появилось газообразование или только помутнение, делают пересевы на среду Эндо.

Чашки с посевами помещают в термостат при температуре 37 °С на 24 ч.

Типичные для кишечной палочки колонии, выросшие на среде Эндо, микроскопируют и делают из них посев на глюкозо-пептонную среду (вторичная бродильная проба). Газообразование в колбах через 24 ч выдерживания посевов при температуре 43 °С окончательно указывает на наличие кишечной палочки в исследуемой воде. При вычислении показателей кишечной палочки следует пользоваться таблицей.

### Бродильная проба

Бродильная проба				Коли-индекс	Коли-титр
100 мл	10 мл	1 мл	0,1 мл		
–	–	–	–	Менее 9	Более 111
–	–	–	+	9	111
–	–	+	–	9	111
–	+	–	–	9,5	105
–	–	+	+	18	56
–	+	–	+	19	53
–	+	+	–	22	46
+	–	–	–	23	43
–	+	+	+	28	36
+	–	–	+	92	11
+	–	+	–	94	10
+	–	+	+	180	6
+	+	–	–	230	4
+	+	–	+	960	1
+	+	+	–	2380	0,4
+	+	+	+	Более 2380	Менее 0,4

Обозначения: «+» – наличие признаков брожения; «–» – отсутствие признаков брожения.

**Идентификация выделенных микробов с бактериями кишечной палочки осуществляется следующим образом:**

1. На среде Эндо отмечают колонии с характерными для кишечной палочки признаками. К числу таковых относятся красные колонии с металлическим

блеском и без него, розовые колонии, бесцветные колонии и бесцветные с розовым центром.

2. Из отмеченных колоний, характерных для групп бактерий кишечной палочки, готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют.

3. Из колоний, состоящих из грамотрицательных неспороносных бактерий, производят высев в пробирки с глюкозо-пептонной средой (среда Эйкмана). Посевы выращивают в термостате при температуре 43 °С в течение 18–24 ч.

4. При учете результатов отмечают колбы с образованием кислоты и газа. Образование газа в бродильных сосудах позволяет отнести культуры бактерий к санитарно-показательным разновидностям кишечной палочки, являющимся индикатором фекального загрязнения водоема.

### **Контрольные вопросы**

1. Правила отбора проб воды для микробиологических исследований.
2. Микрофлора воды рыбоводных водоемов.
3. Методы микробиологического исследования воды.
4. Показатели определения санитарного качества воды: микробное число, коли-титр, коли-индекс.
5. Санитарная оценка воды рыбоводных водоемов.

### **Тема 14. Микробиота иловых отложений**

**Цель занятия:** изучить микробиоту иловых отложений, характеристику активного ила, биопленки и анаэробного ила.

**Материалы и оборудование:** пробы иловых отложений; пробирки с 9 мл стерильной воды или физиологического раствора; пипетки; чашки Петри; МПА; бактериологические петли; предметные стекла; набор реактивов для окрашивания микроорганизмов по Граму; микроскопы; термостат; перманентные маркеры; горелки; чистые салфетки; демонстрационные материалы.

**Задание 1.** Установить состав бактериальной пробы иловых отложений водоема по морфологическим признакам методом пластинок обрастания.

**Задание 2.** Установить состав активного ила, применяемого для очистки сточных вод и подготовки вод к повторному использованию.

**Задание 3.** Инкубировать микрофлору иловых отложений водоема на МПА с последующим описанием культуральных свойств выросших колоний.

**Задание 4.** Приготовить препараты-мазки из проб иловых отложений. Окрасить по Граму. Микроскопировать. Микроскопическую картину зарисовать в тетради.

Составляющей частью рыбоводных водоемов являются иловые отложения. Видовой состав иловой микрофлоры определяется типом водоема, наличием органических веществ, временем года.

Сапрофитная микрофлора иловых отложений представлена аммонификаторами, нитрификаторами, целлюлозоразлагающими и другими бактериями.

В суспензии ила встречаются необычные формы бактерий: спирально-извитые палочки, клетки с простеками, извитые формы.

К анаэробной группе бактерий относятся микроорганизмы, сбраживающие с выделением водорода сахара, органические кислоты, аминокислоты, белки и другие вещества: *C. butyricum*, *Cl. pasteurianum*.

Строгие анаэробы представлены сульфатредуцирующими и метанобразующими бактериями.

На четвертый-пятый год иловые отложения ухудшают гидрохимический состав воды, естественную пищевую базу прудов, и рыбопродуктивность прудов начинает снижаться.

Излишние иловые отложения необходимо периодически удалять. Удобнее всего это делать в период летования. Однако в районах с недостаточным количеством осадков в ряде случаев не представляется возможным проводить осушение прудов в летний период. В связи с этим ил удаляют в осенне-зимний сезон. Ил является ценным удобрением, которое позволяет значительно повысить урожайность сельскохозяйственных культур.

Чтобы избежать чрезмерного заиления прудов, рекомендуется держать их в зимний период без воды, что способствует минерализации иловых отложений и улучшению санитарно-ветеринарного состояния.

Микроорганизмы принимают очень активное участие в трансформации азотсодержащих соединений, в которой выделяют основные биохимические процессы, обеспечиваемые микроорганизмами: гниение (аммонификация), нитрификация, денитрификация, фиксация атмосферного азота.

**Аммонификацию** обеспечивают так называемые аммонифицирующие микроорганизмы, или аммонификаторы (рис. 32).



Рис. 32. Аммонификация и ее возбудители

Среди аэробных аммонификаторов выделяются *Bacillus mycoides* (грибовидная бацилла), *Bacillus mesentericus* (картофельная бацилла), *Bacillus megatherium* (капустная бацилла), *Bacillus subtilis* (сенная бацилла), *Serratia*

*marcescens*. Анаэробную аммонификацию обеспечивают бактерии рода *Clostridium*. Среди факультативно-анаэробных микроорганизмов – перитрихи: чрезвычайно полиморфная бактерия *Proteus vulgaris* и *E. coli*. В процессе аммонификации помимо бактерий активное участие принимают актиномицеты и грибы, но их способность к разложению белковых веществ существенно ниже.

Первая фаза процесса **нитрификации** обеспечивается бактериями рода *Nitrosomonas* (рис. 33), вторая – бактериями рода *Nitrobacter* (рис. 34).

Эти бактерии широко распространены в почвах, особенно в почвах со щелочной реакцией (рН 8–9). Нитрифицирующие микроорганизмы – типичные хемосинтетики, они очень чувствительны к наличию в среде органических соединений. Эти бактерии живут в почве, водах природных водоемов. Немалая роль принадлежит им в разрушении подводных частей бетонных сооружений.



Рис. 33. Нитрификация и ее возбудители



Рис. 34. Нитрификация и ее возбудители

Прямая денитрификация обеспечивается непосредственно денитрифицирующими микроорганизмами (*Bacterium denitrificans* и др.), широко распространенными в почве, водоемах, навозе (рис. 35).



Рис. 35. Денитрификация и ее возбудители

Косвенная денитрификация осуществляется чисто химическим путем при взаимодействии  $\text{HNO}_2$  с аминными соединениями. Микроорганизмы, обеспечивающие денитрификационный процесс, хорошо развиваются в условиях высокой влажности и пониженной аэрации (рис. 36).

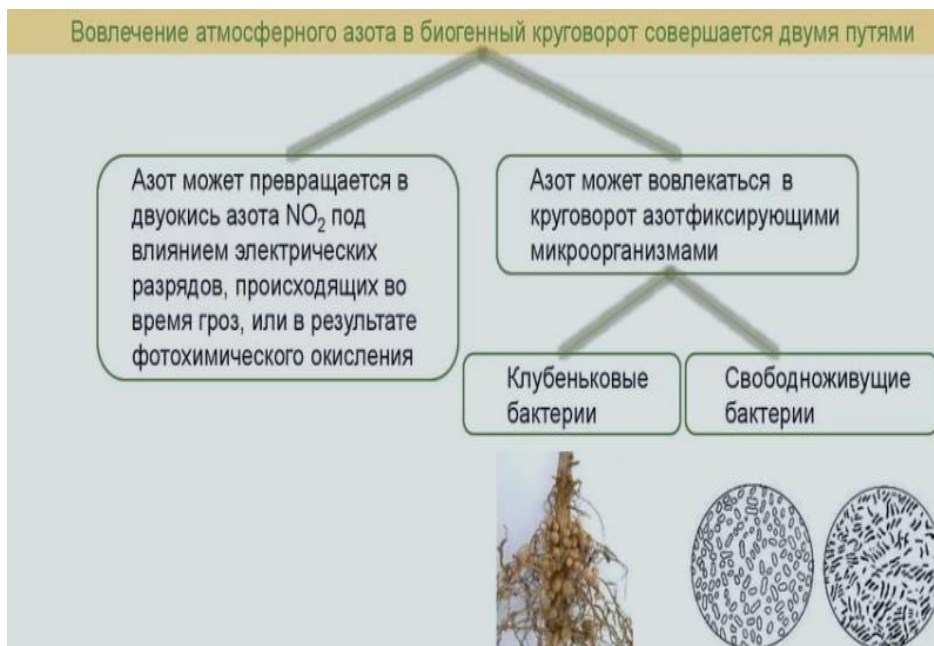


Рис. 36. Процесс нитрификация и денитрификация в водоеме

**Азотфиксацию** осуществляют как симбиотические микроорганизмы, так и свободноживущие (рис. 37).

К первой группе относятся клубеньковые бактерии, живущие в симбиозе с бобовыми растениями, микроскопические грибы в содружестве с небобовыми

культурами и так называемые ассоциативные азотфиксаторы, живущие в содружестве с корневой системой самых различных растений. Вторую группу представляют аэробные (*Azotobacter chroococcum*) и анаэробные (*Clostridium*



*pasteurianum*) азотфиксаторы.

Рис. 37. Схема фиксации атмосферного азота в природе

**Железобактерии** – аэробные микроорганизмы, которые способны осуществлять процессы окисления закисных солей железа и марганца (растворимых в воде) в окисные (нерастворимые). Благодаря этому процессу они способны образовывать железные и марганцевые руды высокой степени чистоты (рис. 38).

- образуют  $Fe(OH)_3$  скопление которого образует болотную железную руду
- виновниками плохого качества воды, загрязняющими почву, водопроводную систему и канализацию.
- скопления железобактерий в водоемах может вызвать гибель молодняка рыб.

Рис. 38. Последствия жизнедеятельности железобактерий

Среди железобактерий выделяются нитчатые бактерии рода *Leptothrix* (рис. 39), гидрат окиси железа у которых откладывается в слизистых капсулах (влагалищах), покрывающих клетки, причем поперечник отложений обычно

превышает поперечник самой бактерии. В то же время отложение железа у бактерий, относящихся к роду *Gallionella*, происходит снаружи бактериальной клетки, хотя сам процесс окисления закиси железа в окись протекает внутри.

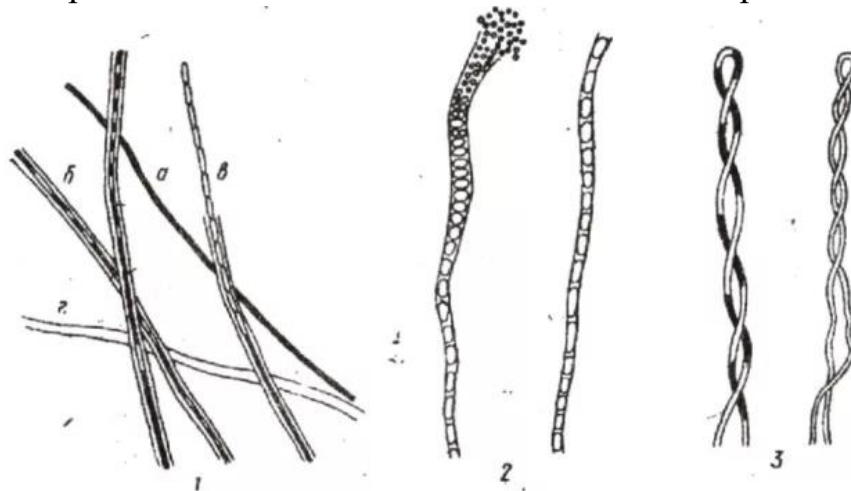


Рис. 39. Нитчатые формы бактерий: 1 – *Leptothrix ochracea*: а – несептированная нить; б – влагалище с клетками внутри; в – нить, выползающая из влагалища; г – старое влагалище; 2 – *Crenothrix polyspora*; 3 – *Gallionella ferruginea*

При гнилостном бактериальном разложении в природе растительных и животных остатков содержащаяся в них сера обычно освобождается в виде сероводорода. Сероводород образуется также в результате восстановления серной, сернистой и серноватистой кислот под действием особых десульфифицирующих бактерий. Оба эти процесса приводят к накоплению в почве и водоемах ядовитого для живых организмов сероводорода, что приводит к их гибели. Образование и накопление сероводорода иногда наблюдается в озерах и лиманах, а воды Черного моря на глубине более 200 м настолько насыщены сероводородом, что ядовиты для живых организмов.

Поэтому окисление сероводорода, в результате которого он утрачивает ядовитые свойства, а сера, входящая в его состав, получает удобную для усвоения форму сернокислых солей, имеет очень важное значение. Такое окисление сероводорода постоянно происходит в природе под действием **серобактерий**.

Самая большая бактерия, носящая имя *Thiomargarita namibiensis*, что в переводе означает «серная жемчужина Намибии», была открыта в 1999 году. Ее размер в поперечнике достигает 0,75 мм и превышает стандартную точку, имеющую диаметр 1/12 дюйма – это равняется 0,351 мм. Бактерия была открыта в донных осадках выровненной окраины материка, вблизи Набийского побережья, Хайде Шульц, немецким биологом и ее коллегами в 1997 году, а в 2005 году, в холодных ключах дна Мексиканского залива, обнаружили близкий штамм, что является подтверждением широкого распространения Набийской серной жемчужины.

Многообразные превращения соединений фосфора сводятся в основном к двум процессам: к расщеплению фосфоросодержащих органических

соединений до образования минеральных веществ и к переводу труднорастворимых фосфорнокислых солей в легкорастворимые.

Растворение минеральных фосфатов осуществляется с помощью кислот (органических или неорганических), которые являются продуктами метаболизма микроорганизмов. Органические кислоты (щавелевая, гликолевая, уксусная, молочная, лимонная и др.), синтезируемые многими гетеротрофными бактериями и грибами, лучше растворяют апатиты, так как кроме снижения уровня рН они образуют хелаты с кальцием.

Включение (иммобилизация) растворимых фосфатов в растущие клетки микроорганизмов наблюдается во всех экосистемах, но количество вовлекаемого фосфора невелико. В водной экосистеме основную массу фосфора накапливает фитопланктон. Известно лишь, что бактериальные клетки содержат значительно большее количество фосфора (1,5–25 % сухого вещества), чем грибы (0,5–1,0 %) или растения (0,005–0,5 %).

Минерализацию фосфорсодержащих органических веществ осуществляют почти все гетеротрофные микроорганизмы, синтезирующие различные ферменты, такие как нуклеазы, фосфолипазы, фитазы и др.

К *микроорганизмам, минерализующим органический азот*, принадлежат аэробные бактерии, грибы, актиномицеты, факультативные и облигатные анаэробы. При анаэробном распаде белковых веществ, называемом гниением, в качестве конечных продуктов образуются аммиак, углекислота, органические кислоты, индол, скатол, сероводород.

Несколько слабее выражена способность выделять аммиак у плесневых грибов, так как они сразу же потребляют его на синтез своих клеток. Многие актиномицеты пожизненно выделяют из клеток протеолитические ферменты.

В водоемах процессы минерализации отмершего планктона начинаются в водной массе, а образование аммиака наблюдается в поверхностном слое ила.

Сапрофитную микрофлору, растущую на мясо-пептонном агаре, в значительной мере отождествляют с физиологической группой аммонификаторов.

К достаточно часто встречающимся в воде рыбоводных водоемов сапрофитам, выделяющим аммиак, как продукт жизнедеятельности, относятся: *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus albidus*, *Bac. filaris*, *Bac. subtilis*, *Bac. mycoides*, *Arthrobakter globiforme*, *Mycobact. globiforme* и др.

Количество аммонифицирующих бактерий в воде водоемов зависит от характера водоема и сезона года.

### **Аэробные биохимические процессы в очистке сточных вод активным илом.**

Комплекс очистных сооружений включает четыре основных блока: механической очистки, биологической очистки, обеззараживания воды и обработки осадков.

В блоке механической очистки из воды изымаются нерастворимые примеси, при этом они разделяются на преимущественно неорганические и преимущественно органические. Последовательность удаления разных примесей обусловлена степенью их дисперсности и удельной массой.

На первой стадии очистки воду процеживают через решетки, задерживающие крупные примеси – отбросы. Сухое вещество отбросов на 95 % состоит из органических соединений. На следующей стадии – в песколовках – вода освобождается от тяжелых минеральных примесей (песок). На последней стадии механической очистки в первичных отстойниках выделяют часть взвешенных веществ, которые в результате седиментации образуют осадок, сырой осадок. Осадок содержит в основном легко загнивающие примеси органического характера.

Применение биологических методов для очистки сточных вод основано на способности различных групп микроорганизмов использовать компоненты этих вод в качестве эффективных источников энергии и материала для построения своего тела. Биологическая очистка может осуществляться в аэробных и анаэробных условиях. Аэробные методы применяют в основном для малоконцентрированных субстратов (концентрация по БПК до 1000 мг/л). Концентрация городских сточных вод по БПК обычно не выходит за пределы 200–400 мг/л. Для их очистки применяют аэробные методы.

Блок биологической очистки включает биоокислитель (аэротенк или биофильтр) и вторичный отстойник. Избыток биомассы постоянно удаляют из биоокислителя, а так как это субстрат органической природы, его передают на сооружения обработки осадка. В процессе механической и биологической очистки исходные загрязнения сточной воды концентрируются в сравнительно небольшом объеме осадков (для городских сточных вод не более 1,5 % от объема отработанной воды).

Очистка сточной воды заканчивается ее обеззараживанием. Для этого на городских станциях очистки сточных вод обычно применяют хлор. В аэробных условиях сточные воды очищают в сооружениях двух основных модификаций: с активной биомассой, взвешенной в воде, или с прикрепленной к материалу инертной загрузкой.

Первый вариант реализуется в аэротенках. Биоценоз аэротенков носит название активного ила.

Активный ил поддерживается во взвешенном состоянии с помощью воздуха. Для микроорганизмов активного ила воздух служит источником кислорода и поддерживает хлопья ила во взвешенном состоянии. Активный ил и сточная вода поступают с одной стороны аэротенка и выводятся с другого торца.

Вторая модификация процесса биологической очистки воды осуществляется в биофильтрах. Важнейшая составная часть биофильтров – загрузочный материал, в качестве которого используют шлак, гравий, керамзит, пластмассовые материалы. Активная биомасса, называемая биопленкой, образует слизистый слой, обволакивающий отдельные элементы загрузки.

Сточная вода подается сверху, орошая поверхность загрузки. Проходя через биофильтр, вода тонким слоем обтекает загрузочный материал, контактируя с биопленкой. Воздух попадает в тело фильтра либо путем естественной тяги, либо нагнетается вентиляторами. Толщина слоя биопленки – 3 мм. Поток воды часть биопленки, в основном отмершая, выносятся из биофильтра и

осаждается во вторичном отстойнике, откуда поступает на сооружения обработки осадка.

#### **Физико-химическая и химическая характеристика активного ила.**

По внешнему виду активный ил представляет собой хлопьевидную массу от светло-серого до темно-коричневого цвета. Хлопья ила густо заселены бактериями, которые заключены в слизистую массу. В диапазоне рН 4–9 хлопья активного ила несут отрицательный заряд, имеют развитую поверхность и большую адсорбционную способность. Механизм хлопьеобразования связан с процессом развития колоний бактерий. На поверхности клеток накапливаются внеклеточные полимеры, которые имеют анионоактивные и неионоактивные функциональные группы. Основная масса внеклеточных полимеров состоит из полисахаридов и белков. В процессе очистки сточных вод интенсивное накопление бактериями полимеров происходит в фазе эндогенного дыхания, сначала клетки окисляют запасные вещества, затем клеточные липиды, углеводы, белки. Образовывать хлопья способны многие роды бактерий. В смешанных культурах хлопья образуются интенсивнее. Структура хлопьев ила видоизменяется при массовом развитии в активном иле нитчатых бактерий и некоторых грибов. Хлопья увеличиваются в размере, становятся рыхлыми. Пружинящиеся нити бактерий, пронизывая хлопья, препятствуют их осаждению. Это явление называется вспуханием активного ила. Наблюдается вспухание при избытке углеводов в сточной воде или недостатке биогенных элементов при недостаточной аэрации. Вспухший ил выносится из вторичных отстойников, ухудшая качество очищенной воды. При этом вспухший ил имеет и полезные свойства. Активная поверхность такого ила больше, чем у обычного, и он лучше изымает из сточной воды органические загрязнения. Также потребность в азоте и фосфоре у нитчатых бактерий существенно ниже, чем у обычных бактерий, поэтому такой ил выгодно использовать для очистки сточных вод с недостаточным количеством биогенных элементов.

Органическое, или беззольное, вещество активного ила состоит из белков, жиров, углеводов. Беззольная часть состоит из кислорода, азота, водорода, углерода. Соотношение этих элементов зависит от состава обрабатываемых сточных вод и технологического режима очистки. Для илов городских очистных станций зольность составляет 25–30 %. По сравнению с клеточным веществом в иле возрастает содержание железа и кремния. При очистке жесткой воды в хлопке ила обнаруживается нерастворимый фосфат кальция, увеличивающий плотность хлопьев и зольность активного ила.

#### **Микробиологическая характеристика активного ила и биопленки.**

Бионаселение активного ила и биопленки представлено микроорганизмами разных систематических групп – бактерии, простейшие, грибы, водоросли, многоклеточные животные, черви, личинки и др. Количество бактерий в активном иле составляет от  $10^8$  до  $10^{14}$  на 1 г сухого вещества. Состав бактериального населения зависит от состава обрабатываемой воды и от условий, в которых осуществляется процесс очистки. К числу самых распространенных бактерий относятся псевдо-монады (50–88 % всего бактериального населения). В активном иле присутствуют аммонифицирующие, целлюлозоразрушающие, жирорасщепляющие,

нитрифицирующие бактерии. В илах биоокислителей развиваются микроорганизмы всех трех температурных групп (психрофильные, мезофильные, термофильные).

В условиях достаточной концентрации кислорода в активном иле преобладают аэробы, но распространены и факультативные анаэробы. Практически всегда присутствуют актиномицеты, обнаруживаются грибы и дрожжи. Массовое развитие грибов нежелательно, так как препятствует осаждению активного ила. Из животного населения встречаются простейшие, которые представлены двумя типами – инфузориями и саргомастигофарами. Функции простейших: питаются бактериями, они регулируют численность их, выполняют санитарную функцию, поедая сапрофитные и патогенные микроорганизмы, они осветляют воду. Микрофлора активного ила более чутко, чем бактерии реагирует на любые нарушения технологического режима, служит индикатором процессов очистки воды в биоокислителях. В аэротенках встречаются более 100 видов микрофауны.

При аэрировании сточной воды прежде всего начинают размножаться амобы и жгутиковые простейшие. В фазе логарифмического роста бактерий из воды извлекается основное количество загрязнений. По мере перехода бактерий в стадию эндогенного дыхания образуются хлопья активного ила.

Условия обитания микроорганизмов в биофильтрах значительно отличаются от условий в аэротенках. Видовой состав бактериального населения активного ила и биопленки идентичны. Однако количественные соотношения видов отличаются. Так, при численности бактерии  $2 \cdot 10^{14}$  в  $1 \text{ м}^3$  аэротенка анаэробы составляют 0,01 %. Если в биофильтре содержится  $1 \cdot 10^{12}$  клеток в  $1 \text{ м}^3$  объема, то из них анаэробы составляют 28,8 %. Объясняется это тем, что концентрация кислорода изменяется как по высоте биофильтра, так и по толщине слоя биопленки, покрывающей загрузочный материал. Пониженная концентрация кислорода наблюдается в верхних слоях загрузочного материала вследствие наиболее высокой нагрузки на них органических веществ.

Основная часть бактерий сосредоточена в биопленке в верхнем слое глубиной до 0,5 м. Здесь интенсивно размножаются грибы, нитчатые бактерии, жгутиковые. Чрезмерное развитие грибов и нитчатых бактерий ухудшает условия аэрации. Поверхность биофильтра часто покрывается слоем водорослей. В их присутствии бактерии легче усваивают трудноокисляемые вещества. В верхней зоне прирост биомассы самый большой при малом видовом разнообразии. В средней зоне биофильтра за счет снижения количества питательных веществ уменьшается численность гетеротрофов – грибов и бактерий, разнообразие микроорганизмов больше, чем в верхнем слое. Нижняя зона биофильтра характеризуется большим видовым разнообразием организмов при малой численности и биомассе. В большом количестве развиваются круглые и малощетинковые черви. Небактериальное население активного ила и биопленки различается. Если в активном иле черви присутствуют в небольших количествах, то в биофильтре они постоянные обитатели. Черви в качестве источника питания потребляют биопленку. Основная масса червей развивается в нижней половине фильтра, куда с поверхности загрузки смывается отмершая биопленка вышележащих слоев.

Минерализуя биопленку и тем самым способствуя ее выносу из биофильтра, черви предотвращают заиливание загрузки. Также черви обеспечивают доступ кислорода к глубоким слоям биопленки, так как, прорывая ходы в биопленке, они делают ее более рыхлой.

### **Микробиологическая характеристика анаэробного ила.**

Анаэробным илом называют биоценоз микроорганизмов, сбраживающих осадки.

Бактериальное население анаэробного ила чрезвычайно разнообразно. Условно оно подразделяется на две группы. Первую группу составляют бактерии, использующие в энергетическом обмене органические вещества исходного субстрата (осадка). Эту группу объединяют под общим названием «кислотообразующие бактерии», так как основными конечными продуктами их жизнедеятельности являются жирные кислоты. Во вторую группу входят специфические виды бактерий, способные превращать метаболиты кислотообразующих бактерий в конечные продукты метанового брожения – метан и диоксид углерода. Бактерии, относящиеся ко второй группе, называют метанобразующими.

Кислотообразующие бактерии представлены облигатными и факультативными анаэробами. Выделено из бродящего осадка от 50 до 92 видов, половину из них составляют спорообразующие формы. Они различны по физиологическим особенностям. Степень развития отдельных физиологических групп зависит от состава обрабатываемых осадков. Органические вещества разлагаются аммонифицирующими, целлюлозными, жирорасщепляющими бактериями. В анаэробном иле найдены денитрификаторы и сульфатредуцирующие бактерии. Обнаружены виды, потребляющие в качестве источника углерода совершенно определенные вещества. Макромолекулы белков, жиров и углеводов разрушаются в основном спорообразующими бактериями. Важное значение в процессах брожения имеют клостридии. В зависимости от используемого субстрата различают: клостридии, обладающие сахаролитической активностью, которые окисляют вещества углеводной природы; клостридии, имеющие активные протеолитические ферменты, в качестве субстрата используют белки и продукты их гидролиза; клостридии, сбраживающие гетероциклические азотсодержащие соединения.

В целом группа кислотообразующих бактерий осуществляет процесс брожения сложных субстратов в широком диапазоне рН. Время генерации для некоторых видов составляет 20–30 мин.

Метанобразующие бактерии включают три рода.

Первый род бактерий включает виды, имеющие форму прямых или изогнутых палочек длиной 3–7 мкм, которые образуют нити, большинство из них неподвижны.

Представители второго рода имеют сферические клетки размером 0,5–10,0 мкм неправильной формы. Клетки могут быть одиночными, располагаться попарно или в виде скоплений. Есть неподвижные и подвижные формы.

Третий род – это неподвижные бактерии, состоящие из крупных сферических клеток размером 1,5–2,5 мкм. Все метаногенные бактерии являются облигатными анаэробами, чувствительны к окислительно-

восстановительным реакциям среды. Оптимальное значение рН для них ограничено узким интервалом 6,8–7,5.

Почти все метаногенные бактерии принадлежат к мезофилам. Оптимальная температура составляет 35–40 °С. Половина метанобразующих бактерий в качестве источника углерода использует углекислый газ. Сложные органические соединения метаногенные бактерии потреблять не могут. Источником азота для метанобразующих бактерий служат аммонийные соединения. Наиболее характерной особенностью метаногенных бактерий является специфичность отдельных видов по отношению к донору водорода. Большинство этих бактерий способны потреблять водород.

#### **Процесс биохимического окисления веществ в анаэробных условиях.**

Стадию кислого брожения осуществляют кислотообразующие бактерии. Благодаря им все органические компоненты осадков подвергаются деструкции (от лат. *destructio* – разрушение). Анаэробный ил обладает гидролитической активностью. В нем обнаружены гидролитические ферменты: протеазы, глюкозидазы, липазы. Под действием этих ферментов исходные вещества осадка и активного ила, подвергаясь внеклеточному гидролизу, превращаются в соединения, которые доступны клеткам бактерии.

Внутриклеточные превращения простых сахаров приводит к образованию пировиноградной кислоты – ключевого промежуточного продукта метаболизма (углеводов, глицерина, аминокислот). В результате разложения аминокислот бактериями появляется аммиак, а в случае серосодержащих аминокислот – сероводород.

Продукты гидролиза жиров используются многими видами кислотообразующих бактерий. В ходе ферментативных реакций глицерин превращается в фосфоглицериновый альдегид, который затем включается в обмен углеводов.

Таким образом, кислотообразующие бактерии превращают белковые соединения, жиры и углеводы осадков сточных вод в низшие жирные кислоты, спирты, аммиак, водород и сероводород.

#### **Микроорганизмы, участвующие в окислении некоторых элементов.**

**Химические элементы** некоторых металлов поступают в водоем с водосборной площади в окисленном состоянии в виде растворенных солей или взвесей и из водной массы оседают в иловые отложения. В зависимости от наличия кислорода, растворенного в воде водоемов, окисление закисных соединений может происходить как в поверхностном слое ила, так и в толще воды.

Нитчатые железобактерии ведут автотрофный образ жизни. В природе они встречаются в местах, где имеется подток грунтовых вод, содержащих закисное железо, а в чистых водоемах образуют рыхлый железистый осадок. Микроскопическое исследование охристого осадка дает возможность рассмотреть скрепление множества цилиндрических трубочек-влагалищ. Некоторые представители железобактерий представляют собой большие скопления из тонких переплетающихся скрученных железистых нитей. На концах стебельков можно видеть бобовидные клетки. Железобактерии ведут автотрофный образ жизни.

Бактерии, окисляющие марганец представляют собой полиморфный организм, накапливающий вокруг себя марганец. Основу строения разнообразных микроколоний этого микроорганизма составляют мелкие кокковидные клетки, сидящие на тонких нитях. В развивающейся культуре эти нити исходят из одного центра, а сама микроколония имеет вид паучка. Сидящие на ножке почки открываются и дают свободноплавающую стадию, которая представляет собой кокковидную клетку диаметром 0,5 мкм.

**Отбор проб иловых отложений.** Пробы иловых отложений для микробиологических исследований отбирают быстро в стерильную посуду. Все металлические части приборов должны быть перед взятием пробы обожжены пламенем паяльной горелки.

Пробы берут различными приборами: щупы, дночерпатели, буры, стратометры и др. Выбор приборов зависит от характера грунтов и глубины водоемов.

Дночерпатель состоит из корпуса с открывающимися створками внизу. В верхней части корпуса имеются крышки, способные свободно открываться и закрываться.

Дночерпатель опускают с поднятыми створками. Нажатием на штангу он врезается в дно водоема, затем штанга поворачивается, и при новом нажатии створки закрываются. Закрытый дночерпатель поднимают на поверхность. Крышку дночерпателя открывают, и стерильной столовой ложкой переносят поверхностный слой грунта в стерильную посуду. Из взятой пробы для микробиологических исследований используются иловые отложения поверхностного слоя толщиной около 1 см. Пробы должны быть исследованы не позднее чем через 2 ч после взятия.

К каждой пробе иловых отложений прилагают сопроводительную записку, в которой отмечают следующее:

- 1) год, месяц, число и час взятия пробы;
- 2) наименование источника и место его нахождения;
- 3) место взятия пробы (расстояние от берега и глубина);
- 4) температура воздуха;
- 5) температура воды в водоеме при отборе пробы;
- 6) краткое описание водоема;
- 7) цель исследований;
- 8) должность и место работы лица, взявшего пробу, и подпись.

#### **Порядок выполнения работы.**

**Метод пластинок обрастания.** Промаркированные, обезжиренные стекла погружают в пробу иловых отложений сразу же после ее взятия. Стекла должны находиться под слоем воды. Время обрастания стекол составляет 48–72 ч. По истечении этого времени стекла извлекают и слегка обсушивают на воздухе. Влажным ватным тампоном снимают обрастания, прикрепившиеся к нижней стороне стекла. Для фиксации микроорганизмов стекло 3–4 раза нижней стороной проводят над пламенем горелки.

Окрашивают пластины обрастания фуксином или метиленовой синью. После окрашивания стекла извлекают и тщательно промывают дистиллированной водой. Высушивают фильтровальным блокнотом и

просматривают под микроскопом в иммерсионной системе увеличения. Микроскопические пейзажи зарисовывают в тетради.

**Количественный учет микробов в иловых отложениях.** Иловые отложения богаты микроорганизмами, поэтому посеы производят из разведений.

В стерильную колбу отвешивают 1 г исследуемого илового отложения. Добавляют 99 мл стерильной воды (или физиологического раствора) и тщательно взбалтывают 10–20 мин. Для лучшего отторжения бактерий от иловых частиц можно прибавить в колбу с навеской ила стерильные мелкие стеклянные шарики, благодаря которым при встряхивании удастся получить большое количество бактерий. Так получается основная суспензия – разведение 1:100. Стерильной пипеткой 1 мл основной суспензии вносят в пробирку с 9 мл стерильной воды. Получают разведение 1:1000. Из этой пробирки после тщательного взбалтывания переносят 1 мл в пробирку с 9 мл стерильной воды. Получают разведение 1:10 000. Аналогичным методом делают последующие разведения: 1:100 000; 1:1 000 000.

Из последних разведений (1:100 000; 1:1 000 000) после тщательного встряхивания делают посеы на мясо-пептонный агар. Стерильной пипеткой по 1 мл разведений переносят в соответствующие чашки Петри. Чашки заливают 10–12 мл расплавленного и охлажденного до температуры 45 °С МПА. Содержимое чашек равномерно распределяют вращательным движением по ровной поверхности стола. После застывания чашки переворачивают вверх дном, подписывают маркером и помещают в термостат для культивирования. Чашки с выросшими посевами просматривают, описывают характер роста колоний (культуральные свойства). Определяют вид микроорганизмов. Подсчитывают количество выросших колоний в каждой чашке. При этом умножают на соответствующую степень разведения. Затем складывают количество микроорганизмов во всех чашках и делят на число учтенных чашек. Получают среднее число микробов в 1 г иловых отложений.

#### ***Приготовление окрашенных препаратов из проб иловых отложений.***

1. Приготовить мазок на предметном стекле.
2. Высушить.
3. Зафиксировать над пламенем горелки.
4. Обозначить восковым карандашом место выполнения препарата.
5. Окрасить сложным методом по Граму.
6. Высушить.
7. Микроскопировать.
8. Микроскопическую картину зарисовать в тетради.

#### **Контрольные вопросы**

1. Методы изучения микробиоты иловых отложений.
2. Отбор средней пробы иловых отложений.
3. Характеристика микробиоты иловых отложений.
4. Микробиологические процессы распада ила.

### **Тема 15. Характеристика микроорганизмов, участвующих**

## **в минерализации органического азота, окислении железа и марганца**

**Цель занятия:** изучить микроорганизмы, участвующие в минерализации органического азота, окислении железа и марганца.

**Материалы и оборудование:** культуры аммонифицирующих микроорганизмов на МПА; пробы ила и воды из водоемов; лакмусовая бумага; бумага, обработанная горячим насыщенным раствором (12 %-ным) щавелевой кислоты; реактив Несслера; МПА; чашки Петри; бактериологические петли; микроскопы; набор реактивов для окрашивания по Граму; предметные стекла; газовые горелки; демонстрационные материалы.

**Задание 1.** Сделать посе́вы проб воды и ила на МПА с последующим изучением и характеристикой культуральных свойств микроорганизмов, участвующих в минерализации органического азота, окислении железа и марганца. Определить вид бактерий.

**Задание 2.** Приготовить препараты-мазки из проб ила и воды рыбоводных водоемов. Окрасить по Граму. Микроскопировать. Микроскопическую картину зарисовать в тетради.

К микроорганизмам, минерализующим органический азот, принадлежат аэробные бактерии, грибы, актиномицеты, факультативные и облигатные анаэробы. При анаэробном распаде белковых веществ, называемом гниением, в качестве конечных продуктов образуются аммиак, углекислота, органические кислоты, индол, скатол, сероводород.

Несколько слабее выражена способность выделять аммиак у плесневых грибов, так как они сразу же потребляют его на синтез своих клеток. Многие актиномицеты пожизненно выделяют из клеток протеолитические ферменты.

В водоемах процессы минерализации отмершего планктона начинаются в водной массе, а образование аммиака наблюдается в поверхностном слое ила.

Сапрофитную микрофлору, растущую на мясо-пептонном агаре, в значительной мере отождествляют с физиологической группой аммонификаторов.

К наиболее часто встречающимся в воде водоемов сапрофитным бактериям, энергично выделяющим аммиак при культивировании на МПБ, относятся следующие: *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus albidus*, *Bac. filaris*, *Bac. subtilis*, *Bac. mycoides*, *Arthrobakter globiforme*, *Mycobacter globiforme* и др.

Количество аммонифицирующих бактерий в воде водоемов зависит от характера водоема и сезона года.

**Характеристика микроорганизмов, участвующих в окислении железа и марганца.** Марганец и железо поступают в водоем с водосборной площади в окисленном состоянии в виде растворенных солей или взвесей и из водной массы оседают в иловые отложения. В зависимости от кислородного режима водоемов окисление закисных соединений железа и марганца может происходить как в поверхностном слое ила, так и в толще воды.

*Leptothrix ochracea* относится к нитчатым железобактериям и ведет автотрофный образ жизни. Она встречается в природе в местах, где имеется подток грунтовых вод, содержащих закисное железо, а в чистых водоемах образует рыхлый железистый осадок. При микроскопическом исследовании охристый осадок представляет собой скрепление множества цилиндрических трубочек-влагалищ шириной 2–3 мкм, длина которых может достигать 1 см. Характерной особенностью нитей *L. ochracea* является то, что они в воде свободно плавают и к субстрату никогда не прикрепляются.

Вид *Gallionella* представляет собой большие скопления из тонких переплетающихся скрученных железистых нитей. На концах стебельков можно видеть бобовидные клетки. Ведут автотрофный образ жизни. Являются аэробами. Растут на минеральной среде с сульфидом железа. Рост на средах идет совместно с бактериями-спутниками. *Gallionella* осаждает только окислы железа, но не марганца.

*Metallogenium personatum* представляет собой полиморфный организм, накапливающий вокруг себя марганец. Основу строения разнообразных микроколоний этого микроорганизма составляют мелкие кокковидные клетки, сидящие на тонких нитях. В развивающейся культуре эти нити исходят из одного центра, а сама микроколония имеет вид паучка. Сидящие на ножке почки открываются и дают свободноплавающую стадию, которая представляет собой кокковидную клетку диаметром 0,5 мкм. Рост на искусственных средах происходит только в культуре с плесневыми грибами или с бактериями-спутниками. Автотрофы. Аэробы.

#### **Порядок выполнения работы.**

##### ***Определение аммиака (продукты гнилостного распада белков).***

Аммиак в среде устанавливают при помощи реактива Несслера. Для этого в фарфоровую чашку пипеткой вносят каплю культуры аммонификаторов, выращенной на мясо-пептонном бульоне, и столько же реактива Несслера.

При наличии аммиака смесь окрашивается в желтый или коричневый цвет. Коричневое окрашивание указывает на большое содержание продукта гнилостного распада.

***Микробиологическое исследование.*** Для выделения микроорганизмов, участвующих в минерализации органического азота, окислении железа и марганца, делают посеы на агар из проб ила и воды.

Перед посевом готовят разведения. Стерильной пипеткой 1 мл исследуемой пробы воды (суспензии ила) вносят в пробирку с 9 мл стерильного физиологического раствора. Получают разведение 1:10. Следующее разведение готовят путем внесения 1 мл из разведения 1:10 во вторую пробирку с 9 мл стерильного физиологического раствора, в результате получают разведение 1:100. Из пробирки с разведением 1:100 стерильной пипеткой 1 мл вносят в пробирку с 9 мл физиологического раствора. Получают разведение 1:1000 и т. д.

Из каждого разведения делают посеы. Посевной материал по 1 мл стерильной пипеткой вносят в чашку Петри. Заливают расплавленным и остуженным до температуры 45 °С агаром. Легкими вращательными

движениями чашек по поверхности стола смешивают их содержимое и оставляют для застывания. Чашки с застывшей средой переворачивают, маркируют и помещают в термостат при температуре 22–23 °С на 48 ч. Для учета медленно растущих микроорганизмов, в частности мико-бактерий, повторный анализ посевов производят через 10 суток.

На мясо-пептонном агаре вырастают аэробные неспороносные бактерии, указывающие на наличие медленно окисляющихся органических веществ.

Просматривают и описывают культуральные свойства выросших колоний. Определяют видовую принадлежность бактерий.

**Микроскопическое исследование.** Из описанных колоний в чашках Петри, проб ила и воды приготавливают мазки, фиксируют и окрашивают по Граму. Мазки рассматривают под световым микроскопом. Анализируют и зарисовывают в тетради.

**Железобактерии в воде могут быть обнаружены следующими способами:**

1. Вода, взятая батометром из исследуемого водоема, помещается в широкие банки. При наличии железобактерий уже на следующий день в банке появляются хлопья, в которых при микроскопировании приготовленных препаратов можно обнаружить железобактерии.

2. Исследуемая вода помещается в аквариум (банку) вместе с илом из того же водоема. Через некоторое время, по оседании ила, в слое воды появляются ватообразные скопления, а затем и ржавые пятна. Помещают на поверхность воды плоскую корковую пробку, в нижнюю сторону которой воткнуто несколько предметных стекол. Пробка свободно плавает в течение 24–36 ч. За это время к поверхности стекол успевает прикрепиться множество железобактерий. Пробку извлекают из воды, с покровных стекол осторожно фильтровальной бумагой удаляют воду, высушивают их на воздухе, фиксируют и окрашивают по Граму.

### **Контрольные вопросы**

1. Методы изучения микроорганизмов, участвующих в минерализации азота, окислении железа и марганца.
2. Характеристика бактерий, осуществляющих круговорот азота в водоемах.
3. Характеристика бактерий, участвующих в окислении железа и марганца.
4. Экология железобактерий.
5. Методика обнаружения железобактерий.

### **Тема 16. Характеристика микроорганизмов, окисляющих соединения серы и фосфора**

**Цель занятия:** изучить микроорганизмы, участвующие в окислении соединений серы и фосфора.

**Материалы и оборудование:** пробы воды и иловых отложений водоемов; чашки Петри; бактериологические петли; предметные стекла; набор реактивов для окрашивания микробов по Граму; фильтровальная бумага, обработанная раствором углекислого свинца; раствор углекислого свинца;

цилиндр; кусок корневища водного растения; пробирки с мясо-пептонным агаром; среда Менкиной; горелки; пипетки; микроскопы; термостат; демонстрационные материалы.

**Задание 1.** Определить наличие микроорганизмов, разлагающих белковые вещества с выделением сероводорода на МПА.

**Задание 2.** Освоить методику получения накопительной культуры бесцветных серобактерий (метод С. Н. Виноградского).

**Задание 3.** Определить наличие фосфорных бактерий в воде рыбоводных водоемов.

**Задание 4.** Приготовить препараты-мазки. Окрасить по Граму. Микроскопировать. Микроскопическую картину зарисовать в тетради.

#### **Характеристика микроорганизмов, окисляющих соединения серы.**

В круговороте серы в водоемах участвуют две основные группы микроорганизмов:

1) микроорганизмы, продуцирующие сероводород (гнилостные сульфатпродуцирующие и серовосстанавливающие бактерии);

2) микроорганизмы, окисляющие сероводород и другие минеральные соединения серы в темноте или на свету (бесцветные серобактерии, пурпурные серобактерии рода *Thiocapsa* и рода *Amoebobacter*, пурпурные несерные бактерии, тионовые бактерии).

Микроорганизмы, образующие сероводород, относятся к родам *Desulfotomaculum* и *Desulfovibrio*. Имеют палочковидную форму или форму изогнутой палочки. Размер клеток 0,4–1,0×2,0–6,0 мкм. Являются анаэробами либо факультативными анаэробами. В питании используют органические вещества, серные соединения (исключением являются гнилостные микроорганизмы), не используют световую энергию. Имеют жгутики. Представители рода *Desulfotomaculum*. Образуют споры.

#### **Характеристика микроорганизмов, окисляющих соединения фосфора.**

Минеральные соединения фосфора поступают в рыбоводные водоемы с удобрениями, стоком с окружающей территории и накапливаются в результате минерализации органических фосфатсодержащих соединений.

Микроорганизмы, способные расщеплять фосфорорганические соединения, должны содержать фермент фосфатазу.

При посеве их на среду с глюкозой, нуклеиновой кислотой и карбонатом кальция вокруг колоний этих бактерий должны образовываться зоны просветления. Минерализация органических форм фосфора с выделением его в виде фосфатов связана с минерализирующей деятельностью всей сапрофитной микрофлоры.

*Фосфорные бактерии* – это крупные палочки с закругленными концами, плотной оболочкой и зернистой цитоплазмой. Размеры клеток 5–6 мкм в длину и 1,8–2,0 мкм в ширину. На ранней стадии клетки расположены поодиночке и слабо подвижны, в дальнейшем они располагаются попарно или короткими цепочками и становятся неподвижными. При старении концы клеток имеют конусообразную форму. Образуют овальные эндоспоры, расположенные внутри клетки. Окрашиваются клетки по Граму, являются аэробами. Оптимальная температура роста составляет 37 °С. На мясо-пептонном агаре

фосфорные бактерии образуют четко окаймленные колонии грязновато-белого цвета. Старые колонии вначале желтеют, а затем приобретают бурую окраску. На среде, содержащей фосфорорганические соединения и мел, вокруг колоний под влиянием кислот образуются зоны просветления.

#### **Порядок выполнения работы.**

**Определение бактерий, разлагающих белковые вещества с выделением сероводорода на МПА.** В готовый стерильный расплавленный мясо-пептонный агар добавляют углекислый свинец, хорошо размешивая его, чтобы получилась равномерно мутная среда. В чашки Петри вносят стерильной пипеткой 1 мл исследуемой воды или иловых отложений. Агаром с добавлением свинца заливают посевной материал в чашках и тщательно перемешивают круговыми движениями по ровной поверхности стола.

Засеянные чашки помещают в термостат при температуре 22–23 °С на 5–6 суток. При развитии колоний бактерий, выделяющих сероводород, вокруг них образуются бурые, почти черные зоны вследствие образования сернокислого свинца. Возбудители процесса – подвижные вибрионы размером 2–4×0,7–0,95 мкм (*Vibrio desulfuricans*). Из типичных колоний приготавливают препараты-мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют. Микроскопическую картину зарисовывают в тетради.

**Получение накопительной культуры бесцветных серобактерий (методика С. Н. Виноградского).** На дно высокого стеклянного цилиндра помещают кусок корневища водного растения, добавляют немного ила или гипса и доливают доверху водой из исследуемого водоема. Развивающиеся серобактерии через 7–10 суток образуют толстую пленку на поверхности среды.

Из накопительной культуры приготавливают микроскопические препараты. Фиксируют над пламенем горелки. Окрашивают сложным методом по Граму. Микроскопируют. Под микроскопом видны нитчатые и одноклеточные круглой, яйцевидной и цилиндрической формы организмы. Внутри клеток видны капельки серы. Микроскопическую картину зарисовывают в тетради.

**Определение фосфорных бактерий на агаризованной среде Менкиной.** Расплавленную среду Менкиной (10–12 мл) вносят в чашку Петри и дают ей застыть. Перед посевом на поверхность среды добавляют каплю лецитина и 1 мл исследуемой воды или иловых отложений. Бактериологической петлей или штапелем посевной материал распределяют по поверхности среды. Чашки переворачивают вверх дном, маркируют и помещают в термостат. Инкубацию посевов производят в течение 7 суток при температуре 24–25 °С. Затем просматривают и анализируют те колонии, которые окружены прозрачной зоной, образовавшейся в результате растворения мела фосфорной кислотой, продуцированной фосфатминерализирующими микроорганизмами.

Приготавливают препараты-мазки. Окрашивают сложным методом по Граму. Микроскопируют. Микроскопическую картину зарисовывают в тетради.

### **Контрольные вопросы**

1. Характеристика микроорганизмов, продуцирующих сероводород.
2. Характеристика микроорганизмов, окисляющих сероводород.
3. Роль микроорганизмов в круговороте фосфора в рыбоводных водоемах.

#### 4. Минерализация органических форм фосфора в рыбоводных водоемах.

### Тема 17. Изучение микроорганизмов, разрушающих клетчатку и вызывающих распад гумусовых веществ

**Цель занятия:** изучить морфологические, физиологические и культуральные свойства микроорганизмов, разрушающих клетчатку и вызывающих распад гумусовых веществ.

**Материалы и оборудование:** пробы воды из водоемов и гумуса; пробирки с 9 мл стерильного физиологического раствора; чашки Петри; бактериологические петли; предметные стекла; набор реактивов для окрашивания по Граму; МПА; пипетки; микроскопы; термостат; газовые горелки; полоски фильтровальной бумаги; препаровальные иглы; колбы; среда Имшенецкого № 2; демонстрационные материалы.

**Задание 1.** Определить качественный состав микроорганизмов, разрушающих клетчатку (целлюлозу) и вызывающих распад гумусовых веществ.

**Задание 2.** Освоить методику определения анаэробных бактерий, разлагающих клетчатку.

**Задание 3.** Приготовить микроскопические препараты. Окрасить по Граму. Микроскопировать. Микроскопическую картину зарисовать в тетради.

Клетчатка подвергается распаду как в аэробных, так и в анаэробных условиях.

Аэробные целлюлозные бактерии относятся к родам: *Cytophaga*, *Cellvibrio*, *Cellfalcula*. По морфологии все они являются палочками, пигментированы. Для своего развития микроорганизмы рода *Cellvibrio* предпочитают нейтральную или слабощелочную среду, а представители рода *Cytophaga* – более кислую. Ниже рН 5,5 распад клетчатки в рыбоводных водоемах идет под действием низших грибов. Бактерии рода *Cytophaga* под микроскопом в неокрашенном состоянии лишены блеска и не имеют резко ограниченных контуров. У них отсутствует дифференцированное ядро. Делятся перетяжками, лишены жгутиков, но подвижны за счет выделения слизи. Растут на МПА. Окрашиваются по Граму отрицательно. Большинство из них разлагают сахара, а клетчатку разрушают лишь на средах с гидролизатом казеина, пептоном и дрожжевым экстрактом (рис. 40).

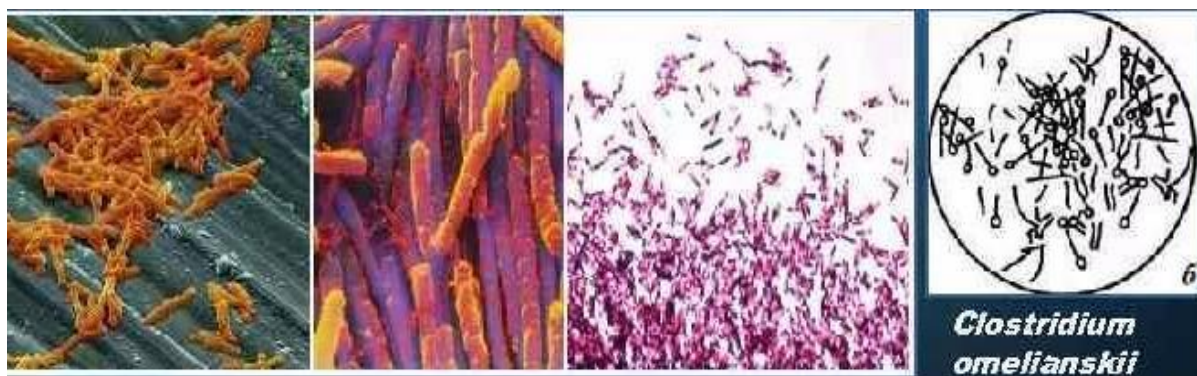


Рис. 40. Бактерии, разрушающие клетчатку и целлюлозу

Анаэробное разложение клетчатки в водоемах осуществляется водородокисляющими и метанокисляющими бактериями.

Водородокисляющие бактерии являются миксотрофами. Способны расти как в автотрофных условиях, используя энергию окисления водорода, так и на обычных питательных средах, как гетеротрофы. Все они – одиночные грамотрицательные палочки с округлыми концами. Некоторые образуют споры.

Метанокисляющие бактерии – палочки разной длины и толщины. Имеют жгутик. Способны развиваться на обычных питательных средах. Используют углеводороды как единственный источник углерода и энергии. Могут быть как автотрофами, так и гетеротрофами.

Большую роль в разложении клетчатки в водоемах играют актиномицеты, грибы, дрожжи, водоросли. Представители низших грибов используют клетчатку в качестве источника углерода и энергии.

Гумус содержит гуминовые кислоты – продукты конденсации полифенолов с аминокислотами. Интенсивность образования и разложения гумуса микроорганизмами зависит от его содержания в водоеме. Гуминовые вещества могут поступать в водоем в готовом виде с болотными водами. Распад гуминовых веществ в водоеме протекает под воздействием бактерий (род *Pseudomonas*), микобактерий (*Mycobacterium*), актиномицетов, низших грибов, водорослей.

#### **Порядок выполнения работы.**

##### ***Исследование микроорганизмов, разрушающих клетчатку.***

Микробиологическое исследование проводят для выявления разных физиологических групп микроорганизмов: гнилостных, маслянокислых, микобактерий, актиномицетов, дрожжей и плесеней.

Перед посевом готовят разведения проб воды из водоемов.

Схема приготовления разведений исследуемых проб воды следующая:

- 1 мл исследуемой воды + 9 мл стерильного физиологического раствора.  
Получают разведение 1:10;

- 1 мл разведения 1:10 + 9 мл стерильного физиологического раствора.  
Получают разведение 1:100;

- 1 мл разведения 1:100 + 9 мл стерильного физиологического раствора.  
Получают разведение 1:1000;

- 1 мл разведения 1:1000 + 9 мл стерильного физиологического раствора.  
Получают разведение 1:10 000;

- 1 мл разведения 1:10 000 + 9 мл стерильного физиологического раствора.  
Получают разведение 1:100 000 и т. д.

Из последних разведений стерильной пипеткой по 1 мл посевного материала вносят в стерильные чашки Петри, заливают расплавленной и охлажденной до температуры 45 °С питательной средой. Содержимое чашки перемешивают круговыми движениями на поверхности стола и оставляют на 10–15 мин. После застывания среды чашки переворачивают вверх дном, маркируют и помещают в термостат при температуре 37 °С на 72 ч.

На 4-е сутки проводят учет физиологических групп микроорганизмов путем подсчета колоний.

Описывают культуральные свойства учтенных колоний. Определяют вид микроорганизмов. Делают препараты-мазки. Окрашивают по Граму. Микроскопируют. Микроскопическую картину зарисовывают в тетради.

**Методика определения анаэробных бактерий, разлагающих клетчатку.** Фильтровальную бумагу, нарезанную тонкими полосками, помещают в высокие пробирки и заливают жидкой средой Имшенецкого № 2. Пробирки закрывают ватными пробками и перемещают в термостат при температуре 35 °С на 1–2 недели. Показателями идущего процесса является распад фильтровальной бумаги и выделение газов.

Для микроскопического исследования берут кусочек разлагающейся фильтровальной бумаги, переносят ее стерильной препаровальной иглой на предметное стекло в каплю воды и разрывают иглой на отдельные волоконца, на которых находятся целлюлозоразлагающие бактерии. Готовят два препарата: один просматривают под микроскопом в неокрашенном виде, другой – после окрашивания сложным методом по Граму.

Возбудителем процесса является бацилла Омелянского (*Bacillus cellulosaе Omeliansky*) – длинные, тонкие, иногда искривленные подвижные палочки с круглой конечной спорой. При спорообразовании клетки на конце раздуваются и становятся похожи на барабанные палочки. Характерным признаком является отсутствие в клетках гранулезы.

**Исследование микроорганизмов, вызывающих распад гумусовых веществ.**

**Приготовление разведений гумуса.** Микроорганизмы в гумусе распределены неравномерно. Поэтому готовят основную суспензию: из средней пробы 1 г гумуса переносят в колбу с 99 мл стерильного физиологического раствора. Для разрушения гумусовых агрегатов, десорбирования микробных клеток основную суспензию взбалтывают в течение 20 мин. Можно использовать для этого стерильные стеклянные шарики. Получают разведение 1:100.

Для приготовления следующего разведения стерильной пипеткой отбирают 1 мл из среднего слоя основного раствора и вносят в пробирку с 9 мл стерильного физиологического раствора. Получают разведение 1:100. Далее приготавливают разведения проб гумуса так же, как и при исследовании воды. Когда все необходимые разведения приготовлены, их встряхивают в течение 5 мин и приступают к посевам методом заливки в агар. Чашки с посевным материалом помещают в термостат при температуре 37 °С на 72 ч.

Описывают культуральные свойства выросших колоний. Делают препараты-мазки. Окрашивают сложным методом по Граму и микроскопируют. Определяют вид бактерий.

### **Контрольные вопросы**

1. Перечислить все микроорганизмы, способные вызвать процесс разрушения клетчатки в водоемах.
2. Какие микроорганизмы вызывают процесс анаэробного разложения клетчатки?
3. Какие микроорганизмы вызывают процесс аэробного разложения клетчатки?
4. В чем заключается практическое значение процессов разложения клетчатки?
5. Какие микроорганизмы вызывают распад гумусовых веществ?

## **Тема 18. Микробиологические методы исследований рыбы, ракообразных и продуктов их переработки**

**Цель занятия:** освоить микробиологические методы исследований рыбы, ракообразных и продуктов их переработки.

**Материалы и оборудование:** пробы рыбы, ракообразных и продуктов их переработки; рыбный фарш; скальпеля; предметные стекла; наборы реактивов для окрашивания по Граму; микроскопы; горелки; чашки Петри; МПА; пробирки с 9 мл стерильной воды; бактериологические петли; пипетки на 1 мл; термостат; стерильный песок; стерильная вода; водяная баня; индикаторная бумага (обработанная 10%-ным щелочным раствором уксуснокислого свинца).

**Задание 1.** Определить степень бактериальной обсемененности рыбы методом микроскопии мазков-отпечатков.

**Задание 2.** Определить количество микроорганизмов в 1 г рыбы и их видовую принадлежность.

**Задание 3.** Определить качество рыбы реакцией на наличие выделения сероводорода.

Основная задача микробиологического контроля рыбы и продуктов ее переработки заключается в изучении видового состава и свойств бактерий, встречающихся на рыбе и рыбных продуктах, их влияния на технологические процессы переработки рыбы, а также в разработке эффективного санитарно-гигиенического контроля предприятий, анализе воды, оборудования, инвентаря, тары, личной гигиены сотрудников. Санитарно-микробиологический контроль рыбного производства подразделяется на основной (профилактический) и дополнительный.

*Основной микробиологический контроль* включает в себя исследование поступающего сырья, вспомогательных материалов, готовой продукции, а также санитарного состояния производства. Он проводится систематически, в сроки, определяемые нормативно-техническими документами производства и контролирующими организациями, в порядке, предусмотренном законом.

*Дополнительный микробиологический контроль* производства проводится в случае стойкой повышенной обсемененности готового продукта микроорганизмами с целью обнаружения и устранения источника

контаминации, а также, если предполагается наличие в продукте возбудителей пищевых токсикозов и токсикоинфекций. Микробиологический контроль осуществляется производственной лабораторией, а при ее отсутствии – сторонними аттестованными организациями.

Мясо рыб имеет рыхлую консистенцию, поскольку в нем меньше соединительных тканей, чем в мясе теплокровных животных. Это способствует распространению микроорганизмов в теле рыбы. Количественный и видовой состав микробиоты свежесловленной рыбы зависит от ее вида, характера водоема, сезона года, района и техники лова и других факторов.

Мышечный сок и мышечная ткань свежесловленной здоровой рыбы считаются стерильными. Значительные количества бактерий обнаруживаются в покровной слизистой оболочке, на наружных жабрах и в желудочно-кишечном тракте. Количество бактерий на этих участках может составлять от  $10^3$  до  $10^6$  на  $1\text{ см}^2$ .

Слизь, покрывающая поверхность рыбы, не только содержит микроорганизмы, но и служит благоприятной средой для их развития.

В теплых водах на поверхности рыбы присутствуют мезофильные микробы – различные виды бацилл, коринебактерий, микрококков. В покровной слизистой оболочке могут содержаться светящиеся бактерии, например, *Photobacterium phosphoreum*.

На поверхности тела рыбы обнаруживаются спорообразующие и беспоровые палочки, микрококки, сарцины и обитающие в воде дрожжи и плесени. Преобладают психрофилы – *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Proteus vulgaris*, бактерии группы кишечной палочки и др.

В умеренных и холодных водах доминируют психрофильные и психротрофные микроорганизмы. В речной и морской водах количество психрофилов на  $1\text{ см}^2$  кожи рыбы колеблется от  $10^2$  до  $10^4$ . Они представлены главным образом бактериями родов *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*. Встречаются также микрококки, коринебактерии, реже спорообразующие палочки рода *Bacillus*, а также дрожжи и актиномицеты. Осетровые рыбы иногда бывают контаминированы палочкой ботулизма (*C. botulinum*). В прибрежных морских водах и во внутренних водных бассейнах поверхность рыбы может быть контаминирована бактериями из семейства *Enterobacteriaceae* родов *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*.

В связи с ухудшением экологической обстановки в разных странах мира, резко возросла опасность заражения рыб патогенными бактериями – шигеллами и сальмонеллами, что требует особенного внимания к санитарной обработке рыбы и изменению ее микробиоты при хранении. Пресноводные рыбы могут длительное время сохранять сальмонеллы в своем организме. Массовая эндогенная контаминация рыб сальмонеллами видов *S. enteritidis* или *S. typhimurium* вызывает у них псевдомембранозные воспаления кишечника.

Энтеропатогенные штаммы стафилококков выделяются обычно во время переработки рыбы, так как эти микроорганизмы составляют около 40 % микрофлоры рук и носоглотки обслуживающего персонала. Чтобы предотвратить обсеменение рыбы стафилококками, температура хранения ее должна быть не выше 10 °С.

На морской рыбе иногда встречается галофильный вибрион *Vibrio parahaemolyticus* – возбудитель гастроэнтеритов и отравлений по типу токсикоинфекций. В жабрах и кишечнике рыб всегда присутствует большое количество разнообразных микроорганизмов. В 1 г содержимого кишечника свежееуснувшей рыбы насчитывается до 105–108 клеток микроорганизмов. Это различные гнилостные бактерии, в том числе спорообразующие: *C. sporogenes*, *C. perfringens*, *C. bifermentans*.

На наружных жабрах и слизистой оболочке рта свежеевыловленной рыбы могут также присутствовать дрожжи, но в дальнейшем при хранении они подавляются бактериями. Выделенные дрожжи были отнесены к родам *Debaryomyces*, *Torulopsis*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Cryptococcus*.

Свежеевыловленная рыба быстро подвергается микробной порче, которая происходит тем быстрее, чем выше температура хранения и чем больше на рыбе микроорганизмов. На поверхности рыбы активно размножаются гнилостные аэробные бактерии, которые поглощают кислород и в результате создают условия для развития анаэробов, при этом процесс гниения смещается внутрь. Развитие гнилостной микрофлоры приводит к сдвигу рН в щелочную сторону, что способствует размножению многих других микроорганизмов. Поэтому после вылова рыбу следует быстро охладить. При резком понижении температуры тела рыбы размножение большинства микроорганизмов приостанавливается. Так, если при температуре 18 °С количество бактерий через одни сутки возрастает до 108–109 в 1 г рыбы, то при температуре около 0 °С рост микроорганизмов задерживается на 24–48 ч, после чего на поверхности охлажденной рыбы и на жабрах начинается размножение психрофильных микроорганизмов. Главными возбудителями порчи рыбы являются бактерии рода *Pseudomonas*. Через 10 суток доля псевдомонад возрастает до 50 % от общего количества, а через 18 суток – до 96 %. Вызывая гнилостный распад белка, псевдомонады образуют значительные количества летучих соединений, в том числе триметиламин, обладающий неприятным запахом, а также газы – H<sub>2</sub>S, NH<sub>3</sub>. Псевдомонады характеризуются не только высокой скоростью роста, но и повышенной ферментативной активностью по отношению к белкам и липидам.

Для охлаждения рыбы часто используется лед в сочетании с хлоридом натрия, которые, в свою очередь, могут быть источниками обсеменения рыбы посторонними микроорганизмами.

Более длительное хранение обеспечивает замораживание рыбы. Если быстро подвергнуть замораживанию свежеевыловленную рыбу, то вся микрофлора располагается на поверхности ее тела, тогда как в толще мышц

микроорганизмов еще нет. Хранение такой замороженной рыбы при температуре не выше  $-12...-15$  °С позволяет длительное время сохранять ее качество (несколько месяцев) и значительно снизить количество микроорганизмов.

В процессе замораживания и длительного холодильного хранения часть микроорганизмов отмирает, но некоторые из них сохраняют свою жизнеспособность, находясь в состоянии анабиоза. При этом чем выше скорость замораживания и ниже температура хранения, тем большее количество микроорганизмов останется жизнеспособным.

На замороженной рыбе обнаруживают преимущественно различные микрококки, спорообразующие и неспорообразующие формы палочковидных бактерий, споры мицелиальных грибов. Допустимое содержание сапротрофных микроорганизмов на замороженной рыбе – до 105 КОЕ/г.

Микробиологическое исследование рыбы и ракообразных проводят для определения микробной загрязненности, пригодности в пищу, несвежести рыбы, больной заразными и незаразными болезнями, при массовой гибели.

Сначала проводят органолептическое исследование, затем микроскопическое и микробиологическое.

Микробиологическое исследование свежей рыбы начинают с приготовления препаратов-отпечатков (бактериоскопический метод), а затем проводят бактериологический анализ.

При органолептическом исследовании обращают внимание на состояние кожи, чешуи, слизи, жабр, глаз, брюшка, внутренних органов, консистенцию мышц, наличие опухолей, запах слизи, жабр и области анального отверстия. Также осуществляют пробу варкой.

Микроскопический метод позволяет быстро определить степень обсемененности рыбы микроорганизмами и их форму.

Микробиологический метод исследования рыбы и ракообразных путем посева на различные питательные среды позволяет определить количество микроорганизмов и их видовую принадлежность.

Серологический метод позволяет идентифицировать возбудителей газовой гангрены (*C. perfringens*) – реакция гемолиза, возбудителей ботулизма (*C. botulinum*) – люминесцентно-серологический метод.

Биологический метод (биопроба) – заражение восприимчивых лабораторных животных для выделения чистой культуры возбудителя и подтверждения предполагаемого диагноза.

**Отбор проб для микробиологического исследования.** При отборе проб необходимо соблюдать стерильность. Пробы следует отбирать в стерильные банки с крышками, бутылки с ватными пробками или в стерильную бумагу с помощью стерильного ножа, ложки или щупа. Хранить при пониженной температуре и исследовать не более чем через 4 ч после отбора.

Для лабораторных исследований отбирают из разных мест не менее 5 % от партии выловленной рыбы или из упаковок, ящиков, бочек несколько экземпляров, наиболее характеризующих всю партию или упаковку рыбы.

Отобранные пробы сопровождаются пояснительной запиской, в которой указывают дату и время отбора пробы, место отбора, цель отбора,

предположительный диагноз или причину, название лаборатории, фамилию, должность и подпись делавшего отбор пробы.

### **Порядок выполнения работы.**

**Микроскопическое исследование.** На предметных стеклах делают два мазка-отпечатка: один – из поверхностных слоев мышц, расположенных под кожей; другой – из мышечной ткани глубоких слоев мышц, находящихся около позвоночника.

Мазки-отпечатки фиксируют над пламенем горелки. Приготовленные препараты окрашивают по Граму. Под микроскопом подсчитывают среднее число микроорганизмов в одном поле зрения.

Рыба свежая – в мазках из поверхностных слоев мышц микробов нет или попадаются единичные кокки и палочки в нескольких полях зрения. Препарат плохо окрашен, на стекле отсутствуют остатки разложившейся ткани.

Рыба сомнительной свежести – в мазках из глубоких слоев мышц 10–20, а из поверхностных – 30–50 микробов в одном поле зрения (диплококки, диплобактерии). Препарат окрашен удовлетворительно. На стекле ясно заметны распавшиеся волокна мышечной ткани.

Рыба несвежая – в мазках из глубоких слоев мышц 30–40, а из поверхностных – 80–100 и более микроорганизмов в одном поле зрения (преобладают палочковидные). Препарат хорошо окрашен, на стекле много распавшейся мышечной ткани.

**Микробиологическое исследование.** Микробиологическому анализу подвергают как плотные, так и жидкие продукты. При исследовании продукта (рыба свежая, рыба мороженая, ракообразные) его поверхность прижигают раскаленным шпателем, затем стерильными ножницами вырезают кусочки из глубины исследуемого объекта и берут навески по 10–15 г. Навеску в стерильной ступке растирают со стерильным песком и небольшим количеством стерильной воды, переносят в стерильную колбу, доводя объем воды до 90–135 мл. Полученную 10%-ную взвесь взбалтывают в течение 5 мин. Для посева используют верхний слой болтушки через серию разведений. Для этого 1 мл исследуемой болтушки вносят в пробирку с 9 мл стерильной воды, получают разведение 1:10. Затем 1 мл разведения 1:10 переносят в пробирку с 9 мл стерильной воды для последующего разведения (1:100) и т. д.

Для определения микробного числа проводят посев по 1 мл в чашки Петри из разведений 1:10; 1:100; 1:1000 и т. д. в зависимости от предполагаемой обсемененности.

Чашки Петри с засеянным 1 мл болтушки заливают расплавленным и остуженным до температуры 40 °С МПА, равномерно распределяют смесь и после застывания агара инкубируют в термостате при температуре 37 °С в течение 48 ч (мезофилы).

Подсчет психрофильных бактерий осуществляется путем посевов на питательные среды и выдерживания в течение 1–2 недель при температуре 0 °С. Рекомендуется также выдержка посевов в течение 16 ч при температуре 17 °С, затем 3 суток при температуре 7 °С или 4 суток при температуре 4–6 °С.

Подсчитывают количество выросших колоний в каждой чашке Петри с учетом их степени разведения. Складывают полученные результаты и делят на число учтенных чашек. Получают среднее арифметическое число бактерий, показывающее количество микробов в 1 г (1 мл) исследуемого материала.

**Методика определения сероводорода (гнилостного распада белков).** В пробирку с пробкой помещают 5–7 г фарша мяса рыбы. Под пробку закрепляют полоску фильтровальной бумаги, смоченную 10%-ным щелочным раствором уксуснокислого свинца. Диаметр капли не более 5 мм. Бумажка не должна прикасаться к мясу и стенкам пробирки. Контролем служит пробирка с фильтровальной бумагой, смоченной дистиллированной водой. Пробирки подогревают на водяной бане при температуре 48–52 °С в течение 15 мин. Затем читают реакцию: рыба свежая – реакция отсутствует; рыба недоброкачественная – бумага изменила цвет на черно-серый.

### **Контрольные вопросы**

1. Микроорганизмы, встречающиеся в рыбе и рыбных продуктах.
2. Источники бактериального загрязнения рыбы и рыбных продуктов.
3. Рыба, ракообразные и продукты их переработки – возможный источник заражения людей и животных.
4. Микробиологические методы определения качества рыбы и рыбных продуктов.
5. Методы предупреждения порчи рыбы и рыбных продуктов.

### **Тема 19. Микробиологический контроль за качеством консервированных рыбных продуктов**

**Цель занятия:** ознакомиться с основными методами контроля за качеством консервированных рыбных продуктов.

**Материалы и оборудование:** консервированные рыбные продукты (пробы соленой рыбы, копченой рыбы, кулинарных изделий, консервных продуктов в железных банках); ножницы; скальпель; штапели; пинцеты; бактериологические петли; предметные стекла, комплект реактивов для окрашивания микроорганизмов по Граму; чашки Петри; МПА; среда Эндо; среда Гисса; пипетки; спиртовые маркеры; горелки; термостат.

**Задание 1.** Определить общую бактериальную обсемененность консервированных рыбных продуктов (соленая рыба, копченая рыба, рыбные консервы в железных банках).

**Задание 2.** Определить наличие бактерий группы кишечной палочки в консервированных рыбных продуктах.

Консервированные рыбные продукты могут вызвать у человека инфекционные заболевания, пищевые токсикоинфекции и токсикозы. При сомнении в доброкачественности консервированной рыбы всех видов обработки и для уточнения органолептических показателей проводят микробиологические исследования.

Микробиологические исследования сырья и полуфабрикатов рекомендуют проводить одновременно со смывами с оборудования, инвентаря и тары, которые могут являться источниками обсеменения бактериями кишечной группы и патогенными микроорганизмами.

На поверхности рыбы обнаруживают кокки, сарцины, палочковидные бактерии, плесневые грибы и дрожжи.

**Микробиота соленой рыбы (сельдь, карп, толстолобик).** Посол является наиболее распространенным способом консервирования рыбы. По чувствительности к хлориду натрия (поваренной соли) микроорганизмы условно подразделяют на три группы.

1. **Галофобные.** К этой группе относятся микроорганизмы, жизнедеятельность которых подавляется при концентрации хлорида натрия 5–6 %. Это в первую очередь большинство гнилостных бактерий, молочнокислые бактерии, кишечные палочки, некоторые патогенные бактерии родов *Salmonella*, *Vibrio*. При содержании в среде около 6 % хлорида натрия подавляется размножение бактерий родов *Pseudomonas* и *Achromobacter*, однако они сохраняют свою жизнеспособность.

2. **Галотолерантные** (факультативные галофилы). Эти микроорганизмы могут расти при концентрации соли от 6 до 15 %. Высокой устойчивостью к действию соли характеризуются стафилококки. Их размножение подавляется лишь при концентрации соли в среде 16–18 %. Значительной устойчивостью к хлориду натрия обладают плесневые грибы. В частности, рост *Aspergillus niger* подавляется при концентрации хлорида натрия 17 %, *Penicillium glaucum* – 19–20 %.

3. **Галофильные** (облигатные галофилы). Для размножения этой группы микроорганизмов оптимальная концентрация соли находится в интервале 3–6 %. Они способны расти в концентрированных солевых растворах или непосредственно в самой соли. Предполагают, что повышенное осмотическое давление или пониженная активность воды в питательной среде стимулируют рост этих микроорганизмов. К этой группе относится *Micrococcus roseus*, который придает красно-розовую окраску соленой сельди.

Основным консервирующим фактором в пресервах является поваренная соль, содержание которой допускается от 3 до 10 %. Для предохранения пресервов от порчи в них добавляют антисептик (бензойную кислоту или бензоат натрия) в концентрации 0,1 % от массы рыбы. Бензоат натрия подавляет главным образом гнилостные бактерии и в меньшей степени плесневые грибы. Молочнокислые бактерии и дрожжи малочувствительны к действию антисептика. В некоторые пресервы вместо бензоата натрия добавляют уксусную кислоту, которая усиливает действие поваренной соли.

#### **Признаки микробной порчи пресервов.**

1. Образование слизи в рассоле. Причиной порока является полимеризация сахарозы, в результате чего образуется соединение оптически левого вращения – леван, или соединение оптически правого вращения – декстран. В рассоле слизь состоит главным образом из левана. Ответственными за

образование левана являются грамотрицательные палочки, а за образование декстрана – *Leuconostocmesenteroides ssp. dextranicum*.

2. Газообразование. В пресервах мелкой упаковки наблюдается газообразование, вызываемое развитием гетероферментативных молочно-кислых бактерий или лейконостоков (*Leuconostoc citrovorum*).

#### **Патогенные микробы в пресервах.**

Благодаря развитию молочнокислых бактерий продукт подкисляется, поэтому *C. botulinum* размножается очень редко. Контаминация пресервов сальмонеллами не имеет какого-либо значения, так как существующие концентрации соли (до 8 %) препятствуют размножению этих микробов. *S. aureus* обладает высокой устойчивостью к соли. Контаминация пресервов золотистым стафилококком происходит в основном от обслуживающего персонала. Размножение золотистого стафилококка и образование им энтеротоксина может происходить при концентрации соли до 10 %. Для того чтобы подавить образование токсина *S. aureus* в пресервах, их необходимо хранить при температуре ниже 10 °С.

Соленую рыбу исследуют на общую бактериальную обсемененность, наличие бактерий группы кишечной палочки. Периодически исследуют готовую продукцию на наличие коагулазоположительного стафилококка, хорошо развивающегося в среде, содержащей 4–5 % соли.

Обсемененность рыбы должна быть не выше 1000–100 000 бактериальных клеток в 1 г. Присутствие бактерий группы кишечной палочки и стафилококка недопустимо.

**Микробиота копченой рыбы.** Копченой называют рыбу, обработанную солью, дымом или коптильной жидкостью.

Различают копчение нескольких видов: дымовое, при котором рыбу коптят дымом, образующимся при неполном сгорании древесины; мокрое, т. е. бездымное – с помощью коптильных препаратов; смешанное – сочетание мокрого копчения и дымового; электрокопчение – путем создания электрического поля высокого напряжения в коптильной камере, в которой частицы дыма с соответствующим зарядом оседают на поверхности рыбы, имеющей противоположный заряд.

В зависимости от температуры, при которой ведется копчение, различают рыбу холодного и горячего копчения. Холодное копчение рыбы проводят при температуре 40 °С в течение 2–5 суток, горячее – при температуре 80–140 °С в течение 1–5 ч.

В процессе копчения рыба обезвоживается, пропитывается веществами дыма, которые придают ей специфические запах и вкус, а осаждаясь на поверхности, окрашивают ее в золотисто-коричневый цвет. Некоторые вещества дыма обладают антисептическими (бактерицидными) свойствами и создают в мясе рыбы неблагоприятные условия для развития микроорганизмов и действия ферментов.

В зависимости от вида рыбы горячего копчения в ней содержится 59,9–69,4 % воды, 21,3–26,0 % белка, 1,2–11,6 % жира. Энергетическая ценность 100 г рыбы горячего копчения составляет 115–192 ккал.

В рыбе холодного копчения содержится 50,0 % воды, 17,1–31,1 % белка, 2,8–16,0 % жира. Энергетическая ценность 100 г рыбы холодного копчения – 94–225 ккал.

*Рыба горячего копчения.* Для горячего копчения используются жирные или средней жирности лещ, сазан, сом, морской окунь, осетровые рыбы, угорь, салака, килька, треска, сельдь, скумбрия, ставрида, камбала, нототения. По видам разделки рыбу горячего копчения вырабатывают неразделанную, потрошеную с головой, потрошеную обезглавленную, обезглавленную, жаброванной, филе, пласт с костью, пласт без кости.

*Требования к качеству рыбы горячего копчения.* Рыба горячего копчения должна быть прокопчена до полной готовности; признаки сырости отсутствуют, мясо проварено, легко отделяется от позвоночника; поверхность чистая, незначительно увлажненная; разделка правильная. Допускаются белково-жировые натёки на поверхности, повреждение жаберных крышек, кожи. Цвет поверхности равномерный, золотистый с оттенком до темно-золотистого; консистенция сочная, суховатая или слегка крошащаяся. Вкус, запах приятные, свойственные рыбе горячего копчения без порочащих признаков. Массовая доля соли – от 1,5 до 2,0 %, для ставриды океанической «Ароматная» – 2,5–4,0 %, для сельдей – 2,0–6,0 %.

Осетровые рыбы горячего копчения по качеству подразделяются на 1-й и 2-й сорта. Рыба 1-го сорта должна быть упитанной, прокопчена до полной готовности, мясо проварено, без признаков сырости, кровь полностью свернувшаяся; поверхность рыбы и брюшная полость чистые, без ожогов кожного покрова, с незначительными повреждениями поверхности и вздутостью кожи. Цвет свойственный для данного вида копченой рыбы, допускаются незначительные светлые пятна в местах обвязки, не охваченные дымом. Консистенция от сочной до плотной. Вкус, запах свойственные рыбе горячего копчения, без порочащих признаков.

В 2-м сорте допускается рыба различной упитанности, небольшие ожоги кожного покрова, консистенция мягковатая, суховатая или слоистая, привкус ила, запах окислившегося жира в поверхностном слое мяса от анального до хвостового плавника. Массовая доля соли – от 1,5 до 4,0 %.

*Рыба холодного копчения.* Для холодного копчения используются лососевые рыбы, вобла, зубатка, сельдь, морской окунь, ставрида, скумбрия, тарань, палтус, угольная рыба.

По видам разделки рыбу холодного копчения выпускают неразделанную, потрошеную с головой, обезглавленную, потрошеную обезглавленную, жаброванную, зябренную, ломтики, кусочки, спинку и др.

*Требования к качеству рыбы холодного копчения.* Рыбу холодного копчения в зависимости от качества подразделяют на 1-й и 2-й сорта. Рыба 1-го сорта различной упитанности, поверхность чистая, невлажная, разделка правильная. Допускаются частичная сбитость чешуи, незначительный налет соли на жаберных крышках. Цвет от светло- до темно-золотистого. Консистенция от сочной до плотной. Вкус и запах свойственные данному виду рыбы, с ароматом копчености, без сырости и других порочащих признаков.

В 2-м сорте допускаются отклонения от правильной разделки, небольшие срывы, трещины и порезы кожи, цвет от золотистого до темно-коричневого, незначительные светлые пятна, не охваченные дымом, слегка ослабевшая консистенция, более резко выраженный запах копчености. Массовая доля соли в рыбе 1-го сорта составляет от 5 до 10 %, 2-го сорта – от 5 до 19 %. Массовая доля влаги – от 42 до 58 %.

Сельди холодного копчения 1-го сорта должны иметь поверхность чистую, с чешуей или без чешуи, незначительный белково-жировой натек, без наружных повреждений, отмякшее, но не лопнувшее брюшко, разделка правильная. Цвет кожного покрова ровный, золотистый. Консистенция нежная, сочная, допускается плотная. Вкус и запах свойственные копченой сельди без порочащих признаков. Массовая доля соли в мясе рыбы – от 5 до 9 %, массовая доля жира – 12 %. Для рыбы 2-го сорта показатели те же, что и для 1-го сорта, но допускаются белково-жировой натек, срывы кожи, лопнувшее брюшко без выпадения внутренностей; соломенный или светло-коричневый цвет; суховатая или слегка ослабевшая консистенция, но не дряблая. Массовая доля соли в рыбе составляет от 5 до 11 %, массовая доля жира – 12 %.

*Упаковка и хранение копченой рыбы.* Копченую рыбу упаковывают в ящики дощатые, из гофрированного картона, в короба плетеные из шпона, в пачки из картона, в пленочные пакеты под вакуумом или без вакуума. Ломтики могут быть расфасованы в металлические или фигурные стеклянные банки. Пакеты, пачки, банки с продукцией упаковывают в ящики дощатые или из гофрированного картона.

На тару с замороженной рыбой наносят надпись «замороженная». Хранят рыбу горячего и холодного копчения при температуре от +2 до –2 °С не более 72 ч с момента окончания технологического процесса. Замороженную рыбу горячего копчения хранят при температуре не выше –18 °С не более 30 суток. Рыба холодного копчения хранится при температуре от 0 до –5 °С и относительной влажности воздуха 75–80 % не более 2 месяцев; фасованная в пачки из картона – не более 15 суток; кусочки, ломтики, фасованные в пленочные пакеты под вакуумом, при температуре от 0 до –4 °С – не более 20 суток (для дальневосточных лососей – 3 суток), без вакуума – не более 10 суток; при температуре от –4 до –8 °С под вакуумом – не более 35 суток (для дальневосточных лососей – 15 суток), без вакуума – не более 10 суток с даты изготовления.

Микробиота копченой рыбы в основном кокковая (80–90 %), кроме этого обнаруживаются споровые и бесспорные палочки.

Большая влажность воздуха в помещении, где хранится копченая рыба, способствует росту плесневых грибов, что приводит к потере товарного вида и порче продукта.

Микробиологическое исследование копченой рыбы включает определение общей бактериальной обсемененности, бактерий группы кишечной палочки не реже двух раз в месяц. Изделия, упакованные в пакеты из полимерных материалов, исследуют на наличие анаэробов.

Бактериальная обсемененность копченой рыбы должна быть 100–10 000 микробных клеток в 1 г. Присутствие бактерий группы кишечной палочки недопустимо.

К дефектам копченой рыбы относятся белобочка, рапа, плесень.

### **Виды порчи копченой рыбы.**

*Влажное гниение* вызывают психрофильные бактерии, которые вызывают изменения в мышечной ткани копченой рыбы: она становится влажной, липкой, издает острый гнилостный запах.

*Сухое гниение* вызывают микрококки и аэробные спорообразующие бактерии, которые сохранили жизнеспособность во время копчения, дрожжи и сарцины. Рыба приобретает матовый оттенок, мышечная ткань становится рыхлой.

*Плесневение* наиболее часто встречается на поверхности рыбы. Возбудителями являются плесневые грибы, которые попадают на рыбу как во время копчения, так и после него.

Отравления копченой рыбой могут возникать из-за содержания на ней сальмонелл, чаще всего *S. typhimurium*. Отравления может вызвать также *C. Botulinum* – возбудитель ботулизма. Реже бывают отравления, вызываемые *C. Perfringens*, *St. aureus*. Стафилококки чаще бывают в рыбе холодного копчения.

**Рыбные консервы.** Рыбные консервы (рис. 41), находящиеся в металлических банках, подвергают микробиологическому исследованию при наличии фактов, вызывающих сомнения в качестве продукта.

Для проверки герметичности банку погружают на 3–5 мин в сосуд, наполненный водой, подогретой до температуры 85 °С. Температуру воды во время анализа поддерживают на одном уровне. Слой воды над банкой должен быть не менее 25–35 см. При этом воздух, находящийся в консервах, нагревается, расширяется и в случае негерметичности банки выходит в виде пузырьков воздуха. Банки с нарушенной герметичностью микробиологическому исследованию не подлежат.



Рис. 41. Классификация рыбных консервов в зависимости от используемого сырья

Герметические банки с консервами исследуют на бомбаж, помещая их в термостат при температуре 37 °С на 5–7 суток. При наличии в содержимом банок микробов, обладающих противолитическим действием, происходит

образование газов, сопровождающееся вздутием банки (биологический бомбаж).

Бактериологическое исследование предусматривает определение общей бактериальной обсемененности и наличие бактерий группы кишечной палочки.

При обнаружении в мышечной ткани сальмонелл, кишечной палочки, золотистого стафилококка, протел, клостридий перфрингенс, рожистой палочки, лептоспир и других патогенных микробов рыбу скармливают животным после термической обработки при температуре 100 °С в течение 20–30 мин. При значительном обсеменении мяса рыб и ракообразных микроорганизмами (более 100 бактерий в одном поле зрения или  $10^5$  в 1 г мяса) и при обнаружении в нем клостридий ботулизма продукт утилизируют или уничтожают.

*Отбор проб для бактериологического исследования.* Стерильным скальпелем консервированную рыбу разрезают, место среза прижигают накаленным на огне скальпелем и отбирают две навески по 1–2 г из глубины и с поверхности консервированного продукта. Каждую навеску отдельно помещают в фарфоровую стерильную ступку и растирают со стерильным песком. Добавляют небольшими порциями стерильную воду или физиологический раствор с таким расчетом, чтобы получить 10%-ную взвесь исследуемого продукта.

#### **Порядок выполнения работы.**

*Определение общей бактериальной обсемененности.* В стерильную чашку Петри вносят 1 мл исходной взвеси исследуемого продукта. Заливают расплавленным и остуженным до температуры 45 °С мясо-пептонным агаром. Подсчет выросших колоний производится по общепринятой методике через 48 ч инкубации посевов в термостате при температуре 37 °С.

*Исследование консервированных рыбных продуктов на содержание кишечной палочки.* Для определения обсемененности консервированной рыбы бактериями группы кишечной палочки 1 мл исходной взвеси засевают на поверхность среды Эндо. Нанесенный материал распределяют штапелем по всей поверхности чашки Петри и помещают в термостат при температуре 37 °С на 24 ч.

Через указанное время посеvy просматривают, обнаруживая колонии, характерные для кишечных палочек (красные колонии с металлическим блеском и без него, розовые колонии, бесцветные и бесцветные с розовым центром). Из отмеченных колоний, характерных для группы бактерий кишечной палочки, готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют.

При обнаружении грамотрицательных неспороносных палочек подсчитывают число колоний и производят перерасчет на 1 г исследуемого продукта.

Из колоний, состоящих из грамотрицательных неспороносных бактерий, производят посев в пробирки со средой Гисса, содержащей глюкозу или маннит. Посевы культивируют в термостате при температуре 43 °С в течение 18–24 ч. При учете результатов отмечают штаммы кишечной палочки, сбрасывающие маннит или глюкозу с образованием кислоты или газа.

При отсутствии роста колоний кишечной палочки на среде Эндо указывают, что при прямом посеве продукта кишечная палочка не обнаружена.

### **Контрольные вопросы**

1. Микробиологические основы заготовки и хранения рыбы.
2. Микробиологические основы методов консервирования рыбы и рыбных продуктов.
3. Профилактика болезней токсикоинфекций и отравлений, вызванных недоброкачественными рыбными продуктами.
4. Факторы, влияющие на качество консервированных рыбных продуктов.
5. Микрофлора консервированных рыбных продуктов.
6. Методы микробиологического исследования качества консервированных рыбных продуктов.