

Куб ГАУ

**кафедра микробиологии,
эпизоотологии и
вирусологии**

**Ведущий преподаватель
доктор биологических наук,
профессор**

Нино Нодариевна Гугушвили

Лабораторные занятия
по общей микробиологии
для факультета
ветеринарной медицины

Тема

**Изучение биохимических свойств
микробов и их чувствительность к
антибиотикам.**

**Микробиологические
исследования воды**

Задание

1. Изучить методы определения биохимических свойств культуры. Сделать посев чистой культуры на МПА с индикаторными бумажками для определения сероводорода и аммиака, посев на цветной ряд.
2. По результатам посевов на предыдущем занятии определить резистентность выделенной культуры к антибиотикам.
3. Метод глубинного посева провести микробиологический анализ воды (чистой, загрязненной и из реки Кубань) для определения общего бактериологического загрязнения (ОМЧ).
4. Ознакомиться с методами определения коли – титра, коли - индекса воды и почвы

1. Изучить методы определения биохимических свойств культуры. Сделать посев чистой культуры на МПА с индикаторными бумажками для определения сероводорода и аммиака, посев на цветной ряд.

Методы определения биохимических свойств

1. Сахаролитические свойства

Выявляют при посеве бактерий на дифференциально-диагностические среды с разными углеводами и индикаторами. Чаще применяют среды Гисса (с индикатором Андрэ, но можно использовать бромтимолблау, бромкрезолпурпур, лакмус и др.). Набор сред с разными углеводами (глюкоза, лактоза, мальтоза, сахароза, маннит, дульцит, арабиноза, сорбит и др.), стерильное обезжиренное простое молоко, молоко с лакмусом, молоко с метиленовым синим – называют пестрым рядом.

Посевы культур осуществляют по общепринятой методике бактериологической петлёй или Пастеровской пипеткой. После инкубирования в термостате учитывают результат ферментации углеводов: изменение цвета питательной среды (в красный цвет при индикаторе Андресэ) означает расщепление углевода и образование в среде кислых продуктов распада.

Если при расщеплении углевода образуется не только кислота, но и газ, происходит вытеснение поплавка пузырьками газа, скапливающимися в его верхней части.

Часто применяют полужидкие среды с углеводами и индикатором ВР (смесь водного голубого и розоловой кислоты), а так же плотные среды с углеводами и индикаторами (агар Эндо, агар Левина, Плоскирева).

Протеолитические способности микроорганизмов

Исследуемую культуру засевают на МПЖ, простое молоко, иногда пользуются свёрнутой кровяной сывороткой лошади, коагулированным белком куриного яйца.

Посев микробов в застывшую столбиком МПЖ

Производят уколом, погружая иглу (или петлю) с исследуемой культурой в глубь питательной среды до дна пробирки.

Посевы с микробами, обладающими способностью расти при 20-22⁰, оставляют при комнатной температуре, остальные посевы инкубируют в термостате. В случае разжижения МПЖ чтобы исключить влияние тепла, пробирки остужают под струёй водопроводной воды. В тех пробирках, где под действием ферментов бактерий произойдёт протеолиз желатина, среда разжижается. Микробы различных видов разжижают желатин неодинаково.

Способность микроорганизмов гидролизовать казеин

Определяют на молочном агаре Эйкмана: к 10 мл. стерильно расплавленного на водяной бане МПА добавляют 3 мл стерильного обезжиренного молока и смешивают, разливают в чашки Петри, остужают.

Посев осуществляют петлёй и шпателем по всей поверхности среды, чтобы получить изолированные колонии. Выдерживают в термостате 24-48 часов. Вокруг колоний образуется чёткая зона просветления молочного агара. При посеве в молоко протеолиз выражается просветлением столбика молока, появлением рыхлого или слизистого осадка на дне пробирки.

Степень протеолиза

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

Индол:

Устанавливают различными методами. Наиболее доступным и удобным считается метод с использованием индикаторных бумажек, приготовленных по определенному рецепту.

Фильтровальную бумагу пропитывают горячим насыщенным водным 12%-ным раствором щавелевой кислоты, высушивают на воздухе, нарезают на полоски (10x0,5 см.) и хранят в стеклянной банке с притёртой пробкой. Чтобы выявить

Чтобы выявить образование индола, исследуемую культуру бактерий засевают в пробирку с МПБ или бульоном Хоттингера, куда вставляют индикаторную бумажку, прижимая её конец ватной пробкой (нижний край бумажки не должен касаться питательной среды). Выдерживают в термостате при 37°C 1-3 дня. При наличии индолообразования нижняя часть индикаторной бумажки окрашивается в розовый цвет (просматривать при проходящем свете).

Определение сероводорода

Определение сероводорода в жидкой среде основано на почернении полоски фильтровальной бумаги, пропитанной 10%-ным раствором уксуснокислого свинца (образуется сернистый свинец черного цвета).

Определение аммиака

В пробирке с засеянной бактериальной культурой закрепляют между стенкой пробирки и пробкой розовую лакмусовую бумажку, которая в присутствии аммиака синееет.

Редуцирующие свойства

Определяют на основании изменения цвета органической краски (метиленовой сини, малахитовой зелени, нейтрального красного и др.), внесённой в питательную среду (часто в молоко). Петлю исследуемой культуры высевают в среду с краской, инкубируют в термостате 24 ч. Под действием микробных ферментов краситель восстанавливается, происходит его обесцвечивание или изменение первоначального цвета.

Редукция нитратов (денитрификация)

Восстановление соли азотной кислоты (нитраты) в соли азотистой кислоты (нитриты), а затем в аммиак и свободный азот, определяют посевом на специальную среду (МПБ с добавлением 2%-го азотнокислого калия, свободного от нитритов) исследуемой бактериальной культуры и через 48-72 ч. культивирования в термостате при 37-38°C добавляют 1 мл. реактива, содержащего в определённых пропорциях йодистый калий и 10%-ную серную кислоту. При редукции нитратов в нитриты среда окрашивается в тёмно-синий цвет.

Определение каталазы

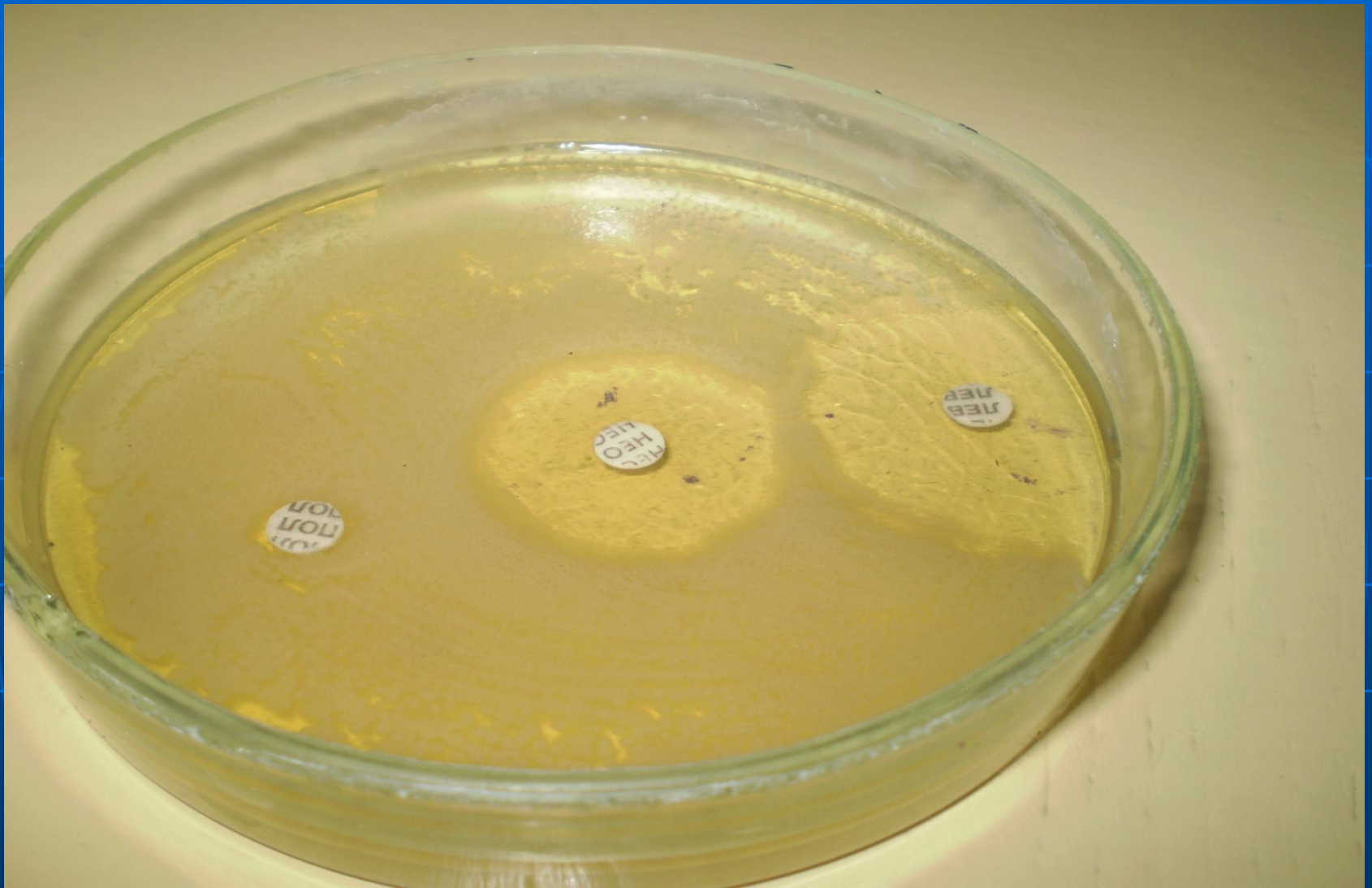
Осуществляют разными способами.

На предметное стекло наносят каплю 3-10%-го раствора перекиси водорода и вносят в неё петлю бактериальной агаровой культуры. Выделение пузырьков газа (кислорода) свидетельствует о наличии у микробов каталазы.

**РИСУНОК
КОСТЕНКО СТР.77**

2. По результатам посевов на предыдущем занятии определить резистентность выделенной культуры к антибиотикам

Чашки Петри с дисками антибиотиков и выросшими колониями микроорганизмов извлекают из термостата и исследуют степень чувствительности отдельных культур микроорганизмов к антибиотикам. Для этого в лабораторный журнал записывают названия антибиотика и значение диаметра зоны (мм) задержки роста микробов вокруг диска, соответствующего данному антибиотику. В том случае, если задержки роста нет, т.е. микроорганизмы устойчивы (резистентны) к антибиотику, диффундирующему в агар, диаметр зоны задержки роста равен нулю. Измерения проводят с помощью линейки со дна чашки Петри.



Чашка Петри с характерным ростом бактерий вокруг дисков с антибиотиками

Результаты определения чувствительности бактерий к антибиотикам

Морфология бактерий	Диаметр зоны задержки роста, мм				
	Левомецетин	Эритромицин	Цефалотин	Неомицин	Ванкомицин
Стаф.	25 мм	0 мм	28 мм	26 мм	30 мм

Примечание: Если диаметр зоны задержки роста меньше 15 мм, то это означает низкую чувствительность бактерий к антибиотикам, 15–25 мм – среднюю чувствительность, больше 25 мм – высокую чувствительность.

3. Метод глубинного посева провести микробиологический анализ воды (чистой, загрязненной и из реки Кубань) для определения общего бактериологического загрязнения (ОМЧ)

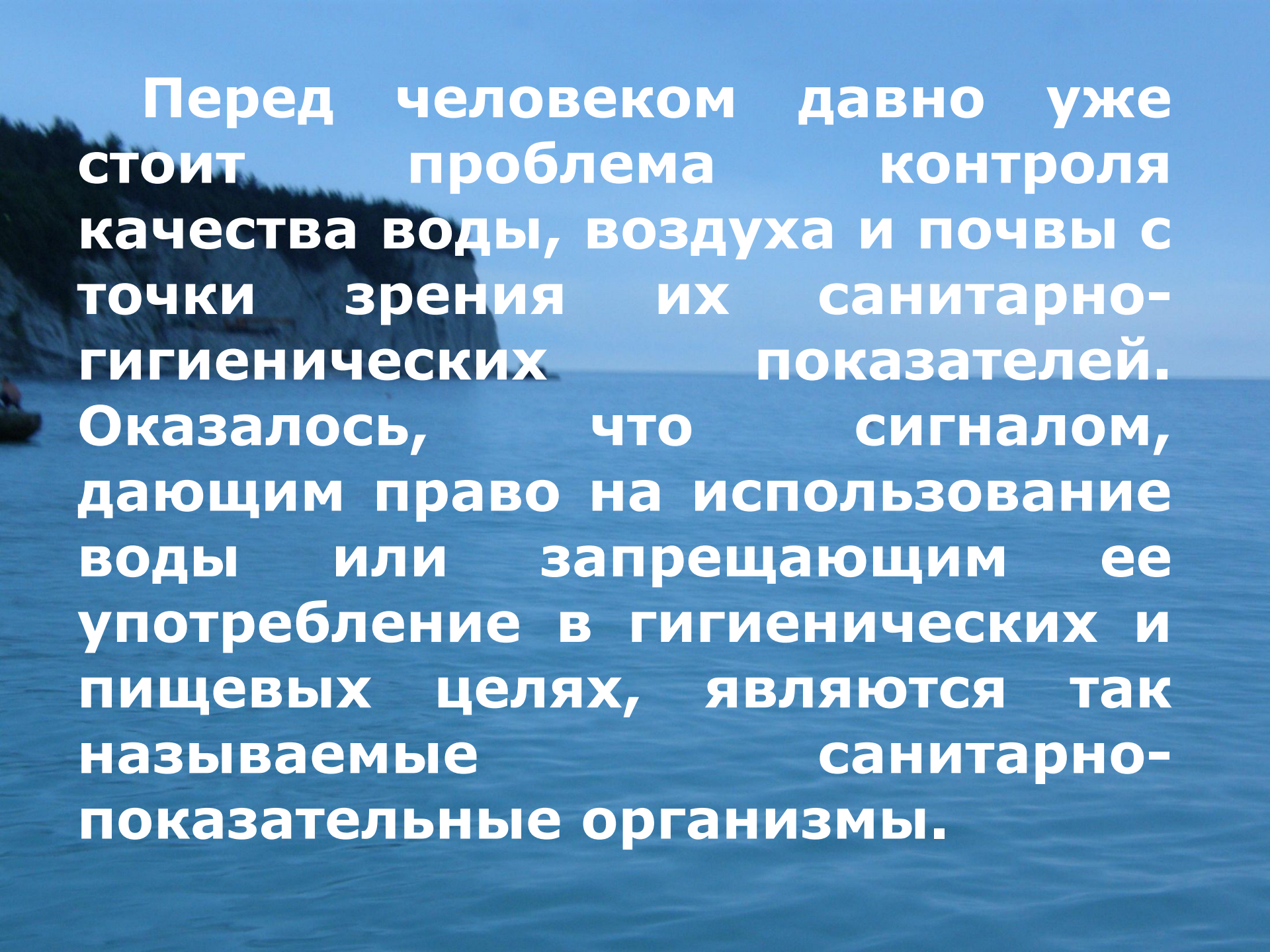
Количество микроорганизмов в 1 г почвы или 1 мл воды рассчитывают по формуле:

$$X = A \cdot K \cdot V$$

A – количество колоний на чашке,

K – степень разведения почвы,

V – объем, высеваемой суспензии на чашку, мл.



Перед человеком давно уже стоит проблема контроля качества воды, воздуха и почвы с точки зрения их санитарно-гигиенических показателей. Оказалось, что сигналом, дающим право на использование воды или запрещающим ее употребление в гигиенических и пищевых целях, являются так называемые санитарно-показательные организмы.

Они должны удовлетворять
следующим требованиям:

- выделяться в окружающую среду в больших количествах человеком или теплокровными животными;
- не размножаться в окружающей среде;
- выживать в окружающей среде в течение сроков, близких к выживанию патогенных форм;
- быть достаточно легко идентифицируемы.

Таким требованиям отвечают популяции кишечной палочки – *Escherichia coli* и ряда других бактерий и вирусов (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Streptococcus faecalis*, *Str. faecium*, энтеровирусы и др.). Представители родов *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* относят к бактериям группы кишечной палочки (БГКП).

Микробиологические показатели загрязненности воды

Показатель	Питьевая вода	Артезианская вода	Вода открытых водоемов
ОМЧ	не более 50	не более 50	не более 1000
Коли-индекс	не более 3	не более 2	не более 9
Коли-титр	не менее 300	не менее 500	не менее 111

ОМЧ – общее микробное число – количество микроорганизмов в 1 мл воды.

Коли-индекс – бактерии группы кишечной палочки (БГКП) в 1 л воды.

Коли-титр – наименьший объем воды, содержащий одну клетку БГКП.

Методы определения коли-титра

Существуют два метода: метод бродильной пробы и метод мембранных фильтров.

Метод бродильной пробы:

Сущность бродильной пробы заключается в том, что исследуемую воду в определённых количествах засевают на среду накопления. Затем при наличии роста, характерного для кишечной палочки, пересевают на дифференциально-диагностические среды.

Показатели чистоты почв по СПМ

Категория почвы	Титры кишечной палочки	Титры нитрифицирующих бактерий	Титры <i>Sl. perfringens</i>	Количество термофильных бактерий в 1 г
Чистая	1,0 и выше	0,1 и выше	0,01 и выше	100–1000
Загрязненная	0,9–0,01	0,01–0,001	0.009–0,0001	1001–100 000
Сильно загрязненная	0,009 и ниже	0,0001 и ниже	0,00009 и ниже	10001–4000000

Титр микроорганизмов – наименьшая масса почвы (г), содержащая 1 клетку указанной группы микроорганизмов.

Присутствие в почве кишечной палочки и термофильных микроорганизмов свидетельствует о достаточно свежем фекальном загрязнении, тогда как споры клостридий, сохраняясь, длительное время в почве, могут свидетельствовать о давнем ее загрязнении. Рост плотности нитрифицирующих бактерий свидетельствует о протекании процессов самоочищения почвы и более полной минерализации органических субстратов.

Благодарю за внимание!