

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРАКТИКЕ

Б2.О.01(У) Учебная ознакомительная практика

Направление подготовки 06.04.01 Биология

Профиль образовательной программы Микробиология

Форма обучения очно-заочная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Цели и задачи учебной ознакомительной практики	3
2. Место прохождения практики и время.....	3
3. Краткая инструкция студенту-практиканту при прохождении практики.....	3
4. Этапы выполнения практики.....	4
5. Примерный перечень вариантов индивидуальных заданий на практику.....	23
6. Учебно-методическое и информационное обеспечение практики.....	23
ПРИЛОЖЕНИЯ	

1. Цели и задачи учебной ознакомительной практики

1.1 Цель практики: закрепление и углубление знаний, полученных обучающимися в процессе теоретического обучения; получение первичных профессиональных умений и навыков для работы по избранному направлению подготовки.

1.2 Задачи практики:

- освоить правила мытья лабораторной посуды, её монтирование и проведение стерилизации различными методами;
- приобрести навыки в изготовлении ватно-марлевых пробок и пастеровских пипеток;
- научиться готовить анилиновые красители для окраски по Граму и бумажек по Синеу, закрепить навыки по окраске мазков;
- отработать технику приготовления питательных сред;
- получить представление о правилах отбора проб воды, воздуха для их микробиологического исследования;
- освоить технику выделения чистых культур микроорганизмов;
- отработать технику биохимической идентификации чистых культур микроорганизмов;
- отработать технику идентификации культур микроорганизмов методом ПЦР;
- освоить методику определения антибиотикорезистентности культур микроорганизмов;
- отработать технику постановки серологических реакций;
- получить представление о методах определения персистентных свойств микроорганизмов, являющихся системообразующими факторами микросимбиоза (биофильное образование, антилизоцимная активность);
- ознакомиться с приёмами оценки антимикробной активности веществ животного и бактериального происхождения методом микротитрования в бульоне.

2. Место прохождения практики и время:

Способы проведения практики: выездная, стационарная.

Стационарная практика проводится в образовательной организации или ее филиале, в котором обучающиеся осваивают образовательную программу, или в иных организациях, расположенных на территории населенного пункта, в котором расположена образовательная организация или филиал.

Выездная практика проводится в том случае, если место ее проведения расположено вне населенного пункта, в котором расположена образовательная организация или филиал. Выездная практика может проводиться в полевой форме в случае необходимости создания специальных условий для ее проведения.

Время проведения практики согласно – календарного учебного графика. Продолжительность практики составляет 6 недель.

3. Краткая инструкция студенту-практиканту при прохождении практики

Перед началом учебной ознакомительной практики студенту необходимо:

- подробно выяснить характер и сроки практики;
- требования, предъявляемые к оформлению отчёта и его защите;
- получить инструктаж о технике безопасности в условиях кафедры;
- получить задания от руководителя практики, которые необходимо выполнить в период прохождения практики (в рамках индивидуального задания).

Обязанности студента в период прохождения учебной практики:

1. систематически вести записи в отчёте по практике с иллюстративным материалом, подтверждающим его работу;
2. заполнение отчёта должно показать знания и умение студента разбираться в работе, которая проводится на определенном этапе;
3. все полученные инструменты, приборы, оставшиеся расходные материалы, реактивы, должны быть своевременно возвращены лаборанту кафедры;
4. перед окончанием практики студент должен полностью оформить отчёт, подготовить доклад и быть готовым отвечать на вопросы руководителя практики и коллег.

4. Этапы выполнения практики

4.1. Подготовительный

Введение. Ознакомительное собрание по практике, инструктаж по технике безопасности, вводный инструктаж по технике безопасности на рабочем месте. Знакомство с лабораторией.

Входить в помещение лаборатории и работать в ней разрешается только в специальной одежде - халате и головном уборе (шапочка, косынка). Халат должен быть застегнут, волосы подобраны.

Не разрешается вносить посторонние предметы; личные вещи (портфели, сумки) оставляют в отведенных для этой цели местах.

Категорически запрещается курить и принимать пищу.

Перед началом работы проверяют исправность приборов и оборудования (спиртовых горелок). О всех неисправностях сообщают ответственному лицу лаборатории.

Не разрешается зажигать одну горелку от другой во избежание взрыва. Для зажигания горелок используют только спички.

Электроприборы включают с разрешения преподавателя или обслуживающего персонала кафедры. Запрещается касаться проводов и контактных частей электросети.

Рабочее место и оборудование содержат в чистоте, соблюдают опрятность в работе.

Исследуемый материал должен рассматриваться как особо опасный. При работе с ним необходимо соблюдать принятые в микробиологической практике технические правила, исключая возможность заражения работника.

Движение культур микроорганизмов (посев, хранение, уничтожение) регистрируют согласно действующей инструкции в специальном журнале.

В случае попадания материала или культур микроорганизмов на пол, стол и т. д. обрабатывают эти поверхности дезинфицирующим раствором.

После окончания работы использованный материал (бактериальные, грибные культуры, инструменты и др.) студенты отдают преподавателю или лаборанту для обеззараживания, рабочее место тщательно убирают и дезинфицируют; моют и дезинфицируют руки, халаты и головные уборы складывают в полиэтиленовые пакеты.

После ознакомления с правилами техники безопасности на кафедре микробиологии студенты расписываются в контрольном листе по технике безопасности.

4.2. Основной

Для предотвращения заражения культур из воздуха и их преждевременного высыхания пробирки и колбы закрывают пробками. Ватные пробки для пробирок и колб изготавливают вручную. Пробки должны быть достаточно плотными с равномерным распределением волокон ваты. Для приготовления пробки берут кусок ваты, загибают края и складывают ее валиком. Для придания пробке прочности ее прокатывают между ладонями или между ладонью и чистым стеклом, лежащим на столе. Длина пробки для пробирки должна быть около 4 см и входить в нее на 1,5-2 см. Изготовленные пробки оборачивают марлей и завязывают нитками (рис. 1).

Проверка качества пробок: хлопок в момент открывания пробирки, очень твердая (“каменная”) на ощупь.

Для колб пробки готовят следующим образом: прямоугольный слой ваты скатать в виде очень плотного, до твердости валика нужных размеров, учитывая диаметр и длину горла колбы, обернуть его двойным марлевым слоем.

Нельзя использовать пробки, изготовленные только из ваты - они легко воспламеняются при обжигании!

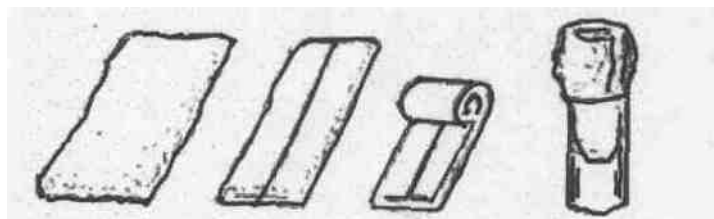


Рис. 1 Изготовление ватно-марлевой пробки

Ватно-марлевые пробки можно изготавливать и машинным способом (рис. 2).



Рис. 2 Машинный способ изготовления пробок

Техника изготовления пастеровских пипеток

Пастеровская пипетка - тонкостенная стеклянная трубка, переходящая в длинный капилляр, запаянный на конце (рис. 3). П.п. широко применяют в микробиологических и вирусологических исследованиях для посева микроорганизмов из жидкого материала, нанесения исследуемого материала в виде капель на предметное стекло, для постановки серологических реакций и т. п.; нередко из П. п. делают шпатель для посева микроорганизмов по поверхности твердой питательной среды. Для приготовления П. п. в условиях лаборатории трубки из легкоплавкого стекла длиной 25–28 см и диам. 0,5–0,8 см нагревают посередине в пламени горелки. Вынув трубку из пламени, растягивают ее концы; середина трубки при этом вытягивается в длинный капилляр, который затем расплавляют в пламени, разъединяя две получившиеся пипетки. П. п. выпускает также медицинская промышленность. В настоящее время наиболее широко стали использоваться пластиковые пастеровские пипетки представляют собой трубку, на одном конце которой находится замкнутый резервуар, используемый для заполнения пипетки, а на другом – вытянутый сужающийся носик. Замкнутый резервуар для наполнения обеспечивает безопасность работы данной пипетки в связи с тем, что образование аэрозоль и контаминация ими любых устройств для заполнения пипеток и окружающей среды исключены. Пастеровские пипетки однократного применения изготовлены из высококачественного полиэтилена низкого давления (ПЭНД): прочного, нетоксичного и инертного. Низкие адгезивные свойства материала обеспечивают полный слив жидкости из пипетки.



Рис.3 Пастеровские пипетки стеклянные

Освоение техники мытья микробиологической лабораторной посуды, её мониторинг для проведения стерилизации.

Для мытья лабораторной посуды в микробиологических лабораториях отводится отдельное помещение – моечная.

Сильно загрязненную посуду со следами жира обрабатывают в хромовой смеси. Хромовая смесь, будучи сильным окислителем, разрушает органические вещества с образованием растворимых или газообразных продуктов. Перед употреблением хромовую смесь подогревают до температуры 45 - 50°C, а затем заливают ею грязную посуду.

Мытье новой лабораторной посуды. В ведре с теплой водой растворяют хозяйственное мыло, чтобы образовалось небольшое количество пены, погружают в нее посуду и ставят на слабый огонь. После 15-минутного кипячения посуду вынимают, ополаскивают чистой водой, погружают в теплый 1–2% раствор хлористоводородной кислоты, доводят до кипения и вываривают 10–15 мин, чтобы нейтрализовать избыток щелочи, который мог остаться при изготовлении стекла. После кипячения в кислоте посуду прополаскивают водопроводной водой и дважды дистиллированной.

При мытье посуды, служащей для постановки серологических реакций, кислоты и щелочи использовать не рекомендуется, так как даже следы этих веществ, оставшиеся на стенках, могут исказить результат реакции. Такую посуду моют горячей водой, кладут на сетки, чтобы с нее стекла вода, затем несколько раз ополаскивают дистиллированной водой и сушат в сушильном шкафу.

Мытье лабораторной посуды, бывшей в употреблении. Посуда, в которой содержался зараженный материал, автоклавируют в режиме гарантирующим гибель находящихся в ней патогенных микробов. Перед мытьем из пробирок, чашек и матрацев обеззараженную жидкость выливают. Не очень загрязненную посуду моют ершом в горячей воде с мылом, содой или в растворе горчицы. Очень загрязненную жирную посуду, не поддающуюся мытью обычным способом, заливают на 30–40 мин хромовой смесью, а затем в течение продолжительного времени промывают проточной водопроводной водой. Простой и надежный способ мытья и обеззараживания лабораторной посуды предложен Г. П. Кирсановым (1972). Отработанную лабораторную посуду стерилизуют в автоклаве в течение 2 ч при 2 атм. После стерилизации, посуду загружают в бак и заливают раствором, содержащим на 100 мл дистиллированной воды 5 мл нашатырного спирта и 3 г порошка для стирки хлопчатобумажного и льняного белья. Лабораторная посуда хорошо отмывается и обезжиривается в течение 30 мин кипячения в указанном растворе, затем ее прополаскивают водопроводной водой и дважды дистиллированной. После этого, посуду высушивают в сушильном шкафу. Обработка посуды, применявшейся для выращивания микобактерий туберкулеза на яичных питательных средах. А.В. Ивановым и соавт. (1974) предложен простой и экономичный способ. Использованные пробирки со средами автоклавируют при 1,5 атм. в течение 30 мин, затем по 250 - 300 пробирок укладывают в бачки или эмалированные ведра с плотной крышкой, заливают 1 % раствором едкого натра и кипя-

тят 2 ч. Во время кипячения остатки питательной среды растворяются, и образуется однородная жидкая мыльно-щелочная смесь, способствующая освобождению пробирок от плотных остатков среды. После 2 ч кипячения мыльно-щелочной раствор переливают в другое ведро для повторного использования (раствор может быть использован 3–4 раза). Прокипяченные отмытые пробирки несколько раз прополаскивают водопроводной водой и высушивают. Посуду, используемую для приготовления и хранения питательных сред и культивирования микробов, нельзя обрабатывать дезинфицирующими веществами, так как даже следы их делают питательную среду непригодной для размножения микроорганизмов.

Мытье градуированных пипеток. Пипетки и другая градуированная посуда, поступающие для работы, должны быть абсолютно чистыми и хорошо обезжиренными. На стенках плохо обезжиренной посуды при вливании жидкости остается большое количество капель, вследствие чего слитый объем жидкости не будет соответствовать той величине, которая указана на шкале деления. Градуированные пипетки, моют следующим образом. С помощью резинового баллончика, надетого на пипетку, насасывают в нее горячую тыльную воду и погружают затем в сосуд с такой же водой. Чтобы вода из пипеток не вытекала, уровень жидкости в сосуде должен соответствовать высоте пипеток. Выдержав 20–30 мин в мыльном растворе, пипетки прополаскивают водопроводной водой и переносят в 1–2% раствор хлористоводородной кислоты, который постепенно доводят до кипения. Далее пипетки обрабатывают так же, как и остальную стеклянную посуду. Закупорившийся канал пипетки прочищают мандреном от тонких игл шприцов. Промытые пипетки складывают в таз, заливают теплым раствором горчицы или мыльной водой и ставят на слабый огонь. После 20–30-минутного кипячения пипетки вынимают и ополаскивают сначала теплой проточной водой, а затем дистиллированной. Сильно загрязненные пипетки также очищают ершом с мылом или содой, и погружают в хромовую смесь, налитую в ванночку или банку, по высоте соответствующую длине обрабатываемых пипеток. В хромовой смеси пипетки выдерживают 20–30 мин, затем в течение нескольких минут промывают проточной и дважды ополаскивают дистиллированной водой.

Сушка и хранение чистой лабораторной посуды. Высушенную посуду просматривают на свет. Стекло ее должно быть совершенно прозрачным, без матового налета и пятен. Вымытую посуду не вытирают, а сушат при комнатной температуре или горячим воздухом в сушильном шкафу при температуре 100–105⁰С.

Монтирование лабораторной посуды для проведения стерилизации

Монтаж пипеток. При монтаже пипеток в верхний конец вставляют ватный тампон. У пипеток Пастера должен быть запаян капилляр. Каждую мерную пипетку заворачивают длинной полоской бумаги шириной 4–5 см, начиная с носика, винтообразно по всей длине. Пипетки Пастера заворачивают в бумагу по 10–20 штук, пробирки – по 15–20 штук. Все виды пипеток лучше хранить до и после стерилизации в специальных металлических пеналах. Пробки на колбах дополнительно покрывают колпачками из бумаги.

Монтаж чашек Петри. Чистые чашки Петри в собранном виде перед стерилизацией заворачивают в бумагу по 3–4 штуки. После стерилизации бумага предохраняет стерильную посуду от загрязнения микрофлорой.

Посуду перед стерилизацией размещают в сушильном шкафу не слишком плотно, чтобы обеспечить циркуляцию воздуха, и следят, чтобы температура не превышала 180⁰С, так как при более высокой температуре бумага и вата будут обугливаться. После окончания стерилизации сушильный шкаф не открывают до тех пор. Пока температура в нем не снизится до 70–80⁰С, поскольку резкий перепад температур может привести к разрушению стекла.

Отработка методов стерилизации (кипячением, стерилизацией в сухожаровом шкафу, УФ-лучами, механической стерилизацией).

Стерилизация – это метод, обеспечивающий гибель в стерилизуемом материале вегетативных и споровых форм патогенных и непатогенных микроорганизмов.

Для стерилизации используют физические и химические методы. При выборе любого из методов должны быть выполнены два основных требования: достижение полного обеспложивания и сохранение физико-химических свойств стерилизуемого объекта.

К физическим методам стерилизации относят: стерилизацию сухим жаром, влажным жаром, фильтрованием, ультрафиолетовыми лучами и др.

К стерилизации сухим нагретым воздухом относят стерилизацию в сухожаровом шкафу (печи Пастера). Этот метод применяют для стерилизации чистой стеклянной посуды и металлического инструментария.

Сухожаровой шкаф представляет собой специальный шкаф с двойными стенками. Снаружи он облицован теплонепроницаемым материалом. В его верхней части находится термометр, на дне помещен автоматический электронагревательный элемент. Принцип работы основан на быстром циркулировании горячего воздуха. Сухое тепло хорошо проникает на поверхности и внутрь предметов, расположенных на металлических решетках внутри камеры. Оно заполняет трещины и углубления, и происходит эффективное обеззараживание инструментов. При включении сухожарового шкафа задаётся режим стерилизации: при температуре 155... 160°C - экспозиция 2 часа; при 165... 170°C - 1...1,5 час, при 180°C – 1 час. Лабораторная стеклянная посуда перед стерилизацией заворачивается в бумагу. Нельзя стерилизовать сухим жаром воспламеняющиеся вещества, питательные среды, резиновые предметы.

Стерилизация влажным жаром также включает в себя ряд методов: кипячение, стерилизация текущим паром, тиндализация, автоклавирование.

Кипячение. Этим методом обычно стерилизуют металлические инструменты, стеклянные и резиновые изделия путем кипячения в дистиллированной воде (лучше в 2% растворе соды) в течение 30-45 мин с момента закипания воды. Стерилизацию осуществляют в специальных стерилизаторах, представляющих собой металлическую коробку с плотно закрывающейся крышкой и вставной решеткой (возможен электрический подогрев). Решётку выстилают двумя-тремя слоями марли. Шприцы стерилизуют в разобранном виде, в иглы вставляют мандрены, у режущих инструментов (скальпелей, ножниц) поверхность обертывают марлей или ватой. После стерилизации воду осторожно сливают, а инструменты используют только после их охлаждения.

Стерилизация ультрафиолетовыми лучами. Под влиянием ультрафиолетовых лучей микроорганизмы погибают, причем максимальная бактерицидная активность наблюдается у лучей с длиной волны 253,7-257,5 нм. Источником их являются ртутно-кварцевые и аргонно-ртутные лампы, работающие на принципе газового разряда, возникающего в парах ртути при определенном напряжении тока, подаваемого на электроды лампы. Около 70% испускаемых лампой лучей составляет ультрафиолетовый спектр с длиной волны 253,7 нм.

Ртутно-кварцевые лампы обладают большой мощностью. Из ртутно-кварцевых ламп чаще используют марки ПРК-2 и ПРК-4. Чаще всего бактерицидные лампы используются для обеззараживания воздуха. Эксплуатация бактерицидных ламп в присутствии людей не допускается. При работе с бактерицидными лампами глаза должны быть защищены очками из простого стекла.

Механическая стерилизация. Осуществляется с помощью фильтрования. Так стерилизуют среды, которые содержат легкоразрушающиеся или летучие компоненты – витамины, аминокислоты (цистеин и цистин), белки, ароматические углеводороды, антибиотики и др. Фильтрование жидкостей осуществляют через мелкопористые материалы, легко адсорбирующие клетки микроорганизмов (асбест, целлюлозу, фарфор, каолин и т.д.). Стерилизующими фильтрами теоретически считают такие, размер пор которых не превышает 0,7 мкм. В практике же пригодность фильтров для стерилизации устанавливают путем пробной фильтрации через них суспензии какого-нибудь мелкого микроорганизма, например *Serratia marcescens*. Для проверки на стерильность фильтрат в большом количе-

стве высевают на питательную среду. Если в течение 5 суток тест-организм не вырастет, фильтры могут быть использованы для стерилизации.

Широкое распространение получили мембранные фильтры. Это диски разного размера, диаметра, напоминающие бумажные. Их готовят на основе нитроцеллюлозы. Мембранные фильтры, в зависимости от величины пор, применяют для фильтрования и стерилизации. Для стерилизации используют фильтры с номера 1 до номера 4 фирмы «Владипор» (Россия). Часто используются фильтры Зейтца - плотные диски, изготовленные из смеси асбеста с целлюлозой. В России выпускают асбестовые фильтры марок Ф2 и СФ. Стерилизующими являются СФ-3 и СФ-4. Асбестовую пластинку помещают в специальный держатель, который обычно изготавливают из нержавеющей стали, и крепко зажимают винтами между верхней (цилиндрической) и нижней (воронкообразной) частями держателя. Трубка нижней части держателя через резиновую пробку проходит в колбу Бунзена.

Приготовление красителей для окраски по Граму. Приготовление питательных сред (МПА, МПБ, среды Эндо) и физиологического раствора

Набор для окраски по Граму предназначен для дифференциальной окраски, исследования структуры клеточной стенки и выявления принадлежности бактерий к грамположительным или к грамотрицательным группам. Принцип метода окраски по Граму основан на разнице в химическом составе клеточной стенки прокариотических микроорганизмов. Грамположительные микроорганизмы способны удерживать комплекс красителей триметилфенолового ряда с йодом, в то время как грамотрицательные микроорганизмы, имеющие другую химическую структуру клеточной стенки, не обладают способностью удерживать комплекс красителей триметилфенолового ряда с йодом.

Использование набора для окраски по Граму.

Предметное стекло перед исследованием обезжиривают и делают на нем мазки исследуемых культур. Мазки следует делать тонкими, чтобы клетки равномерно распределялись на поверхности стекла и не образовывали скоплений. Препарат высушивают на воздухе, фиксируют над пламенем горелки (спиртовки) и выполняют следующие действия:

- на мазок кладут полоску фильтровальной бумаги;
- наносят 2-3 капли из капельницы (50-75 мкл) карболового раствора генциана фиолетового (входит в состав набора для окраски по Граму);
- выдерживают в течение 2 мин;
- удаляют фильтровальную бумагу;
- наносят 2-3 капли из капельницы (50-75 мкл) раствора Люголя (входит в состав набора для окраски по Граму);
- выдерживают в течение 1 мин;
- сливают остатки красителя и раствора Люголя;
- обесцвечивают в течение 30-45 сек 96-градусным этиловым спиртом;
- промывают водой;
- наносят 2-3 капли из капельницы (50-75 мкл) водного раствора фуксина (входит в состав набора для окраски по Граму);
- выдерживают в течение 2 мин;
- сливают краситель;
- промывают препарат водой;
- высушивают на воздухе;
- микроскопируют с иммерсионной системой.

При правильном окрашивании грамположительные бактерии имеют синевато-фиолетовый цвет, а грамотрицательные - розово-красный.

Спиртовые растворы. Эти растворы длительного хранения готовят из сухих порошковых красок. Растворы сначала выдерживают в термостате для лучшего растворения ве-

ществ, затем фильтруют через бумажные фильтры, чтобы избавиться от нерастворившихся микрочастиц, которые при окраске препаратов оседают на клетках, тем самым затрудняя их изучение под микроскопом.

Далее приведены рецепты спиртовых растворов красок, наиболее часто применяемых в микробиологии.

Карболовый фуксин Циля: раствор **А**: основной фуксин – 0,3 г, 96%-й этанол – 10 мл; раствор **Б**: фенол – 5 г, вода дистиллированная – 95 мл. Растворы **А** и **Б** смешивают.

Фуксин Пфейффера – это фуксин Циля, разведенный водой в соотношении 1 : 10 (из-за нестойкости используют только в течение рабочего дня).

Карболовый кристаллический фиолетовый: раствор **А**: кристаллический фиолетовый – 0,4 г, 96%-й этанол – 10 мл; раствор **Б**: фенол – 1 г, вода дистиллированная – 100 мл. Растворы **А** и **Б** смешивают

Модификация по Синеву. Вариант Синева: вместо карболового или анилинового раствора генцианвиолета берут полоски фильтровальной бумаги, заранее пропитанные следующим раствором: кристаллвиолет (1 г), спирт 96°(100 мл), глицерин (не обязательно, 5 мл). Кристаллвиолет может быть заменен метилвиолетом или генцианвиолетом в равных количествах. Через сутки стояния раствор краски готов и может сохраняться долгое время. Фильтровальную бумагу (один слой), помещенную на стекло, обливают указанным раствором краски, высушивают и режут на полоски размером 20×40 мм; бумажки хранят в темной склянке с притертой пробкой.

Приготовление питательных сред (МПА, МПБ, среды Эндо) и физиологического раствора

По целевому назначению различают общеупотребительные (основные), обогащенные, специальные, элективные (избирательные) и дифференциально-диагностические питательные среды.

Мясо-пептонный бульон (МПБ). К 1 л мясной воды добавляют 1 % пептона и 0,5 % хлорида натрия, устанавливают необходимый рН дробным добавлением 10%-го раствора гидроксида натрия или гидроксида калия. Фильтруют через бумажный фильтр, разливают по колбам, пробиркам и стерилизуют при 120°С 15-20 мин.

Мясо-пептонный агар (МПА): к МПБ добавляют 2-3 % промытого мелко нарезанного агара-агара, нагревают до расплавления агара, доводят до кипения, в горячем виде проверяют рН, затем, если необходимо, доводят его до нужного значения (7,2-7,6), фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Профильтрованный горячий агар разливают по пробиркам и колбам, стерилизуют автоклавированием при 1 атм 20-30 мин. Чтобы получить скошенную поверхность агара, удобную для посева, после стерилизации пробирки с расплавленным МПА оставляют при комнатной температуре до уплотнения в наклонном положении (конец с пробкой приподнят). Широко используют культивирование микроорганизмов на плотных питательных средах в чашках Петри. Диаметр стандартной чашки Петри около 10 см, выпускают чашки меньшего и большего диаметров, а также одноразовые пластиковые. В стандартные стерильные чашки Петри над пламенем горелки наливают около 20 мл расплавленного и охлажденного до 45-50°С питательного агара, чашки помещают на горизонтальную поверхность до застывания агара стандартные стерильные чашки Петри над пламенем горелки наливают около 20 мл расплавленного и охлажденного до 45-50°С питательного агара, чашки помещают на горизонтальную поверхность до застывания агара.

Дифференциально-диагностические среды. Предназначены для выявления ферментов у микроорганизмов. По консистенции могут быть жидкими, полужидкими, плотными. В состав этих сред входят основная питательная среда, обеспечивающая рост изучаемого микроорганизма, субстрат для обнаружения фермента и индикатор, по изменению цвета которого судят о сдвиге рН среды в результате расщепления субстрата.

К питательным средам такого типа относят среды Гисса, Эндо, Плоскирева, Левина и др.

Среда Эндо содержит лактозу в качестве субстрата и предназначена для дифференциации бактерий, различающихся по способности расщеплять лактозу.

К 1000 мл расплавленного МПА (рН 7,4) температурой 70⁰С добавляют 1 г лактозы, предварительно растворенной в небольшом количестве дистиллированной кипяченой воды. В отдельных пробирках готовят: 2-3 мл спиртового раствора основного фуксина; 10 мл 10%-го водного раствора сульфата натрия.

В стерильную пробирку вносят 1 мл раствора фуксина и добавляют раствор сульфата натрия до обесцвечивания фуксина. Приготовленную смесь вливают в расплавленный агар, перемешивают и разливают по чашкам Петри. Готовая среда бесцветна, при росте на ней микроорганизмов, расщепляющих лактозу, среда закисляется, обесцвеченный фуксин восстанавливается, и колония микроорганизма, например эшерихий, приобретает красный цвет с металлическим оттенком. Среду готовят за сутки до ее использования. Выпускают также сухую среду Эндо. Перед употреблением определенную навеску порошка вносят в дистиллированную воду, кипятят и разливают по чашкам Петри.

Физиологический раствор – это 0,9% раствор хлорида натрия. Готовится на дистиллированной воде. Стерилизуется методом кипячения.

Отбор проб воздуха и воды для определения общего микробного числа (ОМЧ)

Для оценки санитарно-гигиенического состояния объектов окружающей среды проводят санитарно-бактериологические исследования, цель которых состоит в определении эпизоотологической и эпидемиологической безопасности. Показателем неблагополучия служит выявление патогенных микроорганизмов. Однако прямое их обнаружение связано с большими трудностями, и прежде всего с низкой концентрацией данных микробов, которые в основном не могут размножаться в воде, воздухе и почве. Поэтому в санитарно-микробиологической практике используют косвенные методы, направленные на определение микробной обсемененности объекта и обнаружение в нем так называемых санитарно-показательных бактерий. О бактериальной обсемененности судят по микробному числу - общему количеству микроорганизмов, содержащихся в единице объема или массы (1 мл воды, 1 м³ воздуха).

При контроле санитарного состояния воды исследованию подлежат: вода централизованного водоснабжения, колодцев, открытых водоемов (реки, озера), плавательных бассейнов, сточные жидкости.

Отбор проб воды. Из открытых водоемов пробы воды отбирают с глубины 10...15 см от поверхности и на расстоянии 10... 15 см от дна. Водопроводную воду набирают в стерильные флаконы объемом 0,5 л с притертой пробкой. Предварительно кран обжигают и спускают воду в течение 10... 15 мин. Хлорированную воду перед исследованием нейтрализуют тиосульфатом натрия из расчета 10 мл на 1л воды. Бактериологическое исследование проб воды следует проводить в течение двух часов после отбора или шести часов при температуре хранения 1...5⁰С. Определение микробного числа воды. Водопроводную воду засевают в количестве 1мл, воду открытых водоемов – по 1,0; 0,1; 0,01 мл. Все пробы вносят в стерильные чашки Петри, после чего их заливают 10...12 мл расплавленного и охлажденного до 40-45⁰С питательного агара, который тщательно перемешивают с водой. Посевы инкубируют при 37⁰С в течение 1...2сут. Воду из открытых водоемов засевают параллельно на две серии чашек, одну из которых инкубируют при 37⁰С в течение суток, другую – 2 сут при 20 ⁰С. Затем подсчитывают количество выросших на поверхности и в глубине колоний и вычисляют микробное число воды – количество микроорганизмов в 1 мл.

Микрофлора воздуха зависит от микрофлоры почвы и воды. Воздух – неблагоприятная среда для обитания микроорганизмов из-за отсутствия питательных веществ, действия солнечных лучей, высушивания. Наряду с сапрофитами в воздухе могут находиться патогенные бактерии, споры грибов родов *Aspergillus*, *Mucor* и др.

Санитарную оценку воздуха осуществляют по двум показателям: 1) определение микробного числа воздуха; 2) определение количества санитарно-показательных бактерий – гемолитических стрептококков и стафилококков. Количественные микробиологические методы исследования воздуха основаны на принципах осаждения (седиментации), аспирации или фильтрации. Аспирационный метод подразумевает использование, например, аппарата Кротова, у которого воздух с заданной скоростью засасывается через щель плексигласовой пластины и ударяется о поверхность питательной среды открытой чашки Петри, находящейся на вращающейся подставке, благодаря чему происходит равномерный посев бактерий из воздуха на поверхность МПА (при определении микробного числа) или кровяного МПА (при выделении гемолитических стафилококков и стрептококков). После инкубации в термостате в течение двух суток подсчитывают количество выросших колоний и определяют микробное число воздуха.

Выделение чистых культур микроорганизмов

При бактериологическом исследовании искомым микроорганизм обнаруживают в материале, как правило, в смеси с бактериями других видов. Классическими методами бактериологии возможно идентифицировать микроорганизм только при условии, что он находится в виде чистой культуры.

Методы, основанные на механическом разобщении клеток. Эти методы наиболее часто применяют при выделении чистых культур микроорганизмов.

Метод Пастера (метод разведений): из исследуемого материала готовят ряд последовательных, чаще десятикратных разведений на стерильной жидкой питательной среде в пробирках или колбах (10^{-1} - 10^{-10}). Предполагают, что количество микробных клеток в каждом последующем разведении будет меньше, чем в предыдущем, и в какой-то из пробирок останется только одна микробная клетка, которая и даст/начало чистой культуре микроорганизма. Однако для успешного применения этого метода необходимо, чтобы искомым микроорганизм в материале количественно преобладал над сопутствующими видами.

Метод Коха (метод заливок): исследуемый материал в небольшом количестве вносят в пробирку с расплавленным и охлажденным до 45-50 °С МПА, перемешивают, затем каплю питательной среды переносят во вторую пробирку с расплавленным МПА и т.д. Количество разведений зависит от предполагаемой численности микроорганизмов в исследуемом материале. Затем содержимое каждой пробирки выливают в стерильные чашки Петри, после затвердения среды посеvy помещают в термостат. Фиксированные в плотной среде микробные клетки при размножении формируют колонии, из которых можно отвить (пересеять) чистую культуру микроорганизма.

Метод Дригальского: берут три-пять чашек Петри с плотной питательной средой. В одну из чашек вносят посевной материал и распределяют его шпателем по поверхности питательной среды. Не обжигая шпатель, оставшийся на нем материал последовательно растирают на поверхности среды во второй, третьей и остальных чашках. В последних чашках Петри после инкубирования в термостате обычно наблюдают формирование изолированных колоний бактерий.

Более экономичен *метод секторных посевов*. Бактериологической петлей с посевным материалом несколько раз делают параллельные штрихи в одном секторе чашки Петри с питательным агаром. Петлю прожигают в пламени горелки, дают остыть и часть материала из первого сектора аналогичным образом распределяют во втором секторе, затем в третьем и четвертом секторах. Даже при рассеве бактериальной массы из колоний в четвертом секторе при таком способе получают рост изолированных колоний.

Методы, основанные на биологических особенностях микроорганизмов. Направлены на подавление роста сопутствующей микрофлоры.

Прогревание: при выделении чистой культуры спорообразующего вида бактерий исследуемый материал прогревают при 80°C 20 мин или кратковременно кипятят. Вегета-

тивные клетки сопутствующей микрофлоры в этих условиях погибают, а споры искомого микроорганизма сохраняют жизнеспособность и прорастают после посева на питательные среды.

Использование селективных питательных сред, которые содержат вещества, подавляющие рост сопутствующей микрофлоры (антибиотики, красители и т. д.), - частый прием при исследовании контаминированного материала. Однако необходимо учитывать, что селективные факторы часто находятся не в бактерицидных, а в бактериостатических концентрациях, поэтому клетки сопутствующих микроорганизмов не растут, но остаются жизнеспособными на поверхности питательной среды и при отливке колоний исследуемой культуры на обычные среды могут быть причиной получения смешанной культуры.

Биопроба – заражение чувствительных лабораторных животных – метод, с помощью которого не только выделяют возбудитель из патологического материала, но также изучают вирулентность чистой культуры. Организм животного с его защитными факторами служит биологическим «фильтром», который уничтожает сопутствующую непатогенную микрофлору, но не способен подавить размножение вирулентных бактерий, что позволяет достаточно легко выделить возбудитель в чистой культуре из тканей погибшего или убитого с диагностической целью животного.

При выделении чистых культур некоторых видов бактерий используют их другие биологические особенности. Например, способность микроорганизма расти при низких (листерии) или высоких (термофильные бактерии) температурах, которые лежат за пределами температурных диапазонов сопутствующих видов бактерий. Для выделения культуры *P. vulgaris* используют способность данного вида давать ползучий рост (роение) на поверхности плотной питательной среды. С этой целью материал, содержащий *P. vulgaris*, засевают в конденсационную воду на дне пробирки со скошенным МПА, не касаясь поверхности среды. Сопутствующая микрофлора растет в нижней части питательной среды, а протей в виде прозрачной пленки распространяется вверх.

Для выделения *C. tetani* материал засевают точечно на плотную питательную среду в чашках Петри и после выращивания отливают культуру с периферии ползучего роста.

Биохимическая идентификация чистых культур микроорганизмов

Для идентификации большинства гетеротрофных микроорганизмов необходимо определить, какие углеводы и спирты обеспечивают рост изучаемого микроорганизма и какими изменениями среды он сопровождается. Как правило, для этих целей используют следующие углеводы: арабинозу, ксилозу, глюкозу, фруктозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, а также спирты – глицерин и манит. Рост на средах с этими соединениями может приводить к накоплению органических кислот, нейтральных продуктов, газов.

Выявление сахаролитической активности микроорганизмов. Для выявления способности микроорганизмов разлагать определенные углеводы с образованием кислот и газообразных продуктов используют среды Гисса (предложены амер. бактериологом Ph. H. Hiss), содержащие различные углеводы (глюкозу, сахарозу, мальтозу, лактозу и др.) и индикаторы (например, реактив Андреде, меняющий свой цвет от бледно-желтого до красного в интервале рН 7,2-6,5 или индикатор ВР – смесь водно-голубого и розоловой кислоты, из бесцветной превращающейся в синий), поэтому эти среды нередко называют «пестрым» или «цветным» рядом. Каждую пробирку заполняют 3-5 мл жидкой среды с поплавками для обнаружения газообразования. Сбраживание лактозы в молочных средах определяют по их свертыванию или изменению цвета лакмусового индикатора, а также при пептонизации. Среда засевают одной бактериальной петлей 18-часовой агаровой культуры и помещают в термостат на 24-48 часов. Положительный результат реакции проявляется изменением цвета среды соответственно введенному в нее индикатору. Газообразование определяют по скоплению пузырьков газа на дне трубок Дюрхема (поплавков) (прил., рис. 13А).

Ферментация углеводов иногда происходит медленно, поэтому предварительный учет результатов проводят через 24-48 ч, а окончательный – через 10-14 суток инкубирования посевов. В этом случае используют среду Кларка и среду Фогеса-Проскаура.

Для определения у бактерий интенсивности кислотообразования из глюкозы (реакция с метиловым красным) применяется дифференциально-диагностическая питательная среда Кларка (W.M. Clark – амер. химик). Для ее приготовления в ступке смешивают 5 г пептона, 5 г глюкозы, 5 г двухосновного фосфорнокислого калия (K_2HPO_4). Смесь растворяют в 800 мл дистиллированной воды и в течение 20 мин подогревают при помешивании на водяной бане. Горячий раствор фильтруют через полотняный или бумажный фильтр, охлаждают до температуры 20 °С. Доливая дистиллированную воду, доводят объем до 1000 мл, разливают в пробирки по 5 мл и проводят дробную стерилизацию в течение 3 дней подряд. Исследуемую 2-5 суточную культуру засевают в среду. При сильном кислотообразовании ($pH < 5,0$) появляется красное окрашивание, при слабом кислотообразовании ($pH > 5,0$) – желтое окрашивание (прил., рис. 13Б).

При идентификации многих микроорганизмов используют реакцию Фогеса-Проскауэра (O. Voges и B. Proskauer – нем. бактериологи) на ацетин (промежуточное соединение при образовании бутандиола из пировиноградной кислоты). Для этого к 3-5 мл пятидневной культуры, выращенной на среде Кларка, добавляют 1 мл свежеприготовленного 10% спиртового раствора α -нафтола и 1 мл 20% водного раствора гидроксида калия и ставят в термостат при температуре 37 °С. Так как окраска появляется постепенно, реакция читается через 18-24 часа. При образовании ацетилметилкарбинола наблюдается розовая окраска с желтой флоккуляцией, характерная для спиртового раствора эозина (положительная реакция). В случае отрицательного результата окраска не появляется, среда остается бесцветной. Реакция дает положительный результат у бактерий, сбраживающих глюкозу. Реакция получается четче в культурах тех бактерий, которые дают отрицательную реакцию с метиловым красным, т. е. при $pH > 5,0$.

Выявление протеолитических и других ферментов микроорганизмов. Некоторые виды микроорганизмов синтезируют протеолитические ферменты – протеиназы, катализирующие гидролиз белков. Для выявления протеолитических ферментов испытуемые микроорганизмы выращивают на питательных средах, в состав которых входит белковый субстрат – желатин, казеиноген, кусочки коагулированного яичного белка или мяса. Вследствие специфичности ферментов протеолитическая активность одного и того же микроорганизма на питательных средах с разными белковыми субстратами проявляется неодинаково, поэтому для дифференциальной диагностики и идентификации разных видов микроорганизмов рекомендуют питательные среды с различными белковыми субстратами.

Тест на протеолитическое разжижение желатина. Желатин – коллоид, в теплой воде набухает и растворяется, при низкой температуре превращается в гель. Тест основан на необратимом полном или частичном разжижении желатина под воздействием микробных протеаз.

Бактериологической иглой или петлей стерильно отбирают микроорганизмы со скошенного агара и засевают в столбик желатина уколом. Продолжительность культивирования от 3 до 10 суток при комнатной температуре. Разжижение желатина отмечают визуально. Если желатин разжижается, указывают интенсивность и форму разжижения – слоистое, воронкообразное, мешковидное, кратеровидное, реповидное, пузыревидное. При необходимости культивирования в термостате (при 37 °С) опытную пробирку с засеянным МПЖ и контрольную с чистой средой после культивирования охлаждают под холодной водой и по «текучести» желатины делают заключение о наличии фермента.

Тест на гидролиз казеина в плотных питательных средах: обезжиренное молоко диализуют для удаления лактозы, которая ингибирует гидролиз казеина. В расплавленный питательный агар с двойной концентрацией агар-агара добавляют равный объем стерилизованного автоклавированием диализованного молока. Исследуемую культуру бактерий засевают «штрихом» на поверхность питательной среды, разлитой в чашки Петри. Посевы

инкубируют до 14 суток. Перед учетом результатов поверхность среды заливают 10%-м раствором соляной кислоты. Положительный результат - просветление среды вокруг колоний.

При разложении белка некоторыми бактериями могут выделяться индол, сероводород, аммиак. Для их определения служат специальные индикаторные бумажки, которые помещают между горлышком и ватной пробкой в пробирку с МПБ или (и) пептонной водой, засеянными изучаемыми микроорганизмами.

Методика определения сероводорода. Над культурой исследуемых микробов помещают полоску фильтровальной бумаги, смоченную раствором уксуснокислого свинца или сульфатом железа (бумага закрепляется между пробкой и стенкой пробирки). Пробирки помещают до трех суток в термостат. Почернение бумаги происходит при выделении сероводорода, который превращает уксуснокислый свинец в сернокислый или в нерастворимый сульфид железа (прил., рис. 13В). Продукцию сероводорода можно определить также путем посева исследуемой культуры микробов уколом в столбик с питательной средой, содержащей различные соли (сульфат железа, тиосульфат натрия, сульфит натрия). При образовании H_2S среда окрашивается в черный цвет за счет образования сульфида железа (FeS).

Методика определения индола. Определение индола по методу Морелли осуществляют с помощью полоски фильтровальной бумаги, обработанной горячим насыщенным 12% 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.

Также индол можно определить по методу Эрлиха. Для этого в пробирку с исследуемой культурой микробов добавляют 2-3 мл эфира, энергично перемешивают и прибавляют несколько капель реактива Эрлиха (спиртовой раствор параметиламидобензальдегид с хлористоводородной кислотой). При наличии индола наблюдается розовое окрашивание или розовое кольцо (прил., рис. 13Г).

Методика определения аммиака. Над культурой исследуемых микробов помещают полоску увлажненной красной лакмусовой бумаги (бумага закрепляется между пробкой и стенкой пробирки). Пробирки помещают в термостат. В присутствии аммиака бумага синее.

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.

Тест на редуцирующую способность бактерий (в метиленовом молоке) основан на следующей особенности: при окислительно-восстановительных реакциях у бактерий акцептором водорода может быть кроме молекулярного кислорода ряд органических красителей, которые, присоединяя водород, восстанавливаются и обесцвечиваются. Такие свойства отмечены у лакмусовой настойки, метиленового синего, малахитового зеленого и т.д. Например, молоко с метиленовым синим готовят так: молоко подщелачивают 10%-м раствором карбоната натрия до pH 7,2 и добавляют 20 мл 1%-го водного раствора метиленового синего на 1000 мл. Готовая среда голубого цвета. Результат учитывают через сутки инкубирования посевов. В случае редукции красителя среда окрашена в кремовый цвет.

Важным биохимическим свойством у ряда микробов является их *способность восстанавливать нитраты в нитриты*. Для определения нитритов используют реактив Грисса, который готовят из 2 растворов: (первый – 0,5 г сульфаниловой кислоты, растворенной в 30 мл ледяной уксусной кислоты, с последующим добавлением 100 мл воды; второй – 0,1 г нафтиламина, растворенного в 100 мл кипящей воды, с последующим добавлением 30 мл ледяной уксусной кислоты). Оба раствора смешивают в равных объемах,

0,1 мл реактива добавляют в культуру бактерий. Окрашивание культуры в красный цвет указывает на присутствие нитритов.

Важным признаком у микробов является способность к образованию фермента *каталазы*, катализирующей реакцию разложения перекиси водорода с образованием воды и кислорода, ее содержат аэробы и факультативные анаэробы, но не анаэробы. Для обнаружения фермента небольшое количество исследуемой культуры эмульгируют в капле перекиси водорода, наблюдая выделение пузырьков кислорода.

Определение цитохромоксидазы (фермента, обеспечивающего перенос электронов на атом кислорода в процессе анаэробного дыхания) проводят при дифференциации энтеробактерий, применяя смесь 1% спиртового раствора β -нафтола и 1% водного раствора N-диметил-парафенилендиамина дигидрохлорида, смешанных в соотношении 2:3. На полоску фильтровальной бумаги, смоченной этим реактивом, наносят петлей культуру микроорганизмов. При наличии фермента через 2-5 мин полоска окрашивается в синий цвет.

Гидролиз мочевины определяют по выделению аммиака (лакмусовая бумажка) и изменению реакции среды в щелочную сторону (с pH 7,2 до 8,8, при этом среда приобретает пурпурно-красный цвет).

Тест на уреазу: исследуемую культуру микроорганизма засевают на среду Кристенсена (пептон 1 г, хлорид натрия 5 г, дигидрофосфат калия 2 г, агар 20 г, глюкоза 1 г, 0,2%-й раствор фенолрота 6 мл, 20%-й раствор мочевины 100 мл, вода дистиллированная 1000 мл) и выращивают 1-4 сут. Положительный результат – покраснение среды в результате ее защелачивания.

Тест на общую фосфатазу: исследуемую культуру микроорганизма засевают «штрихом» на поверхность питательного агара с натриевой солью дифосфата фенолфталейна, инкубируют 4-5 сут. Чашки переворачивают вниз крышкой, на внутреннюю поверхность которой наносят каплю 28-30%-го раствора нашатырного спирта. При наличии фосфатазы колонии приобретают красный цвет.

Кроме сред Гисса для биохимической идентификации микроорганизмов используют современные диагностические тест-системы: API (Франция), Lachema (Чехия), Roshe-Tube (Германия), и др. Микротест-системы для биохимической идентификации различных микроорганизмов представляют собой полистироловые планшеты или панели, в лунках которых находятся сухие дифференциально-диагностические среды для определения ферментации, ассимиляции, оксидации, деградации и гидролиза различных субстратов. Для ускорения идентификации в лунки добавляют хромогены или флюорохромы, которые могут быть выявлены химическими или флюориметрическими методами при помощи приборов. В настоящее время для этих целей созданы полуавтоматические или автоматические бактериологические анализаторы iEMS (Labsystems, Финляндия) и MiniAPI (или его аналог ATB-Expression, bioMerieux, Франция), а также автоматические системы VITEK и VITEK2 (bioMerieux, Франция), BD Phoenix (Becton Dickinson, США), WalkAway (Dade Behring, США). В основе работы этих приборов лежит оценка микробного роста методом периодических измерений панелей с хромогенными, флюорогенными и индикаторными биохимическими субстратами при помощи методов колориметрии, турбидиметрии и проточной цитометрии.

Идентификация чистых культур микроорганизмов методом ПЦР

Проводят выделение ДНК из чистой культуры микроорганизмов с помощью комплекта реагентов ДНК-экспресс. Для этого суточную агаровую культуру петлей вносят в пробирку с реагентом, перемешивают на микроцентрифуге-встряхивателе в течение 10 секунд, помещают пробирку в твердотельный термостат и инкубируют при температуре 98 °С в течение 20 минут. После завершения инкубации пробирки центрифугируют при 12000 об/мин при комнатной температуре в течение 15 секунд. Надосадок помещают в чистые пробирки. Полученный супернатант используют в качестве исследуемого образца ДНК для постановки реакции амплификации.

Амплификацию проводят в термоциклере «Терцик» (ДНК-технология, Россия) по протоколу. Реакционная смесь включает 1 мкл бактериального лизата, по 0,5-1 мкл специфических праймеров для видовой идентификации микроорганизмов, 0,8 мкл дезоксирибонуклеозид-трифосфатов (10 mM, Thermo Scientific, США), 2,5 мкл 10xПЦР-буфера (Хеликон, Россия), 1,5 мкл хлорида магния (25 mM, Fermentas, Литва), 0,2-1 мкл фермента Таq-полимеразы (5 ед/мкл, Хеликон, Россия). Реакционную смесь доводят до 25 мкл водой без нуклеаз (Fermentas, Литва).

Продукты амплификации генов анализируют путем электрофоретического разделения в 1-2%-ном горизонтальном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. В качестве маркеров применяют GeneRuler 1 kbp DNA Ladder и GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Литва). Плотность агарозного геля и маркеры молекулярного веса подбирают в зависимости от молекулярной массы продуктов амплификации. Результаты визуализируют в ультрафиолетовом свете.

Положительное заключение о наличии гена делают при обнаружении в дорожке специфической светящейся полосы определенной массы, которую устанавливают по линейке молекулярных масс.

Для документирования полученных результатов гелевые пластины фотографируют.

Определение антибиотикорезистентности культур микроорганизмов

В ходе повседневной деятельности в ветеринарных лабораториях чувствительность микроорганизмов к антибиотикам преимущественно определяют диско-диффузионным методом (ДДМ), руководствуясь Методическими указаниями МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». Метод основан на диффузии антибиотика из носителя в плотную питательную среду и подавлении роста исследуемой культуры в той зоне, где концентрация антибактериального препарата превосходит минимальную подавляющую концентрацию (МПК).

Для получения правильных результатов определения чувствительности ДДМ следует использовать только стандартизированные качественные диски. Каждый диск содержит определенное количество антибиотика, которое указано на этикетке флакона. Во флаконах с дисками содержится специальный влагопоглотитель (силикагель), который впитывает влагу и служит индикатором: при переувлажнении он меняет окраску с синей на розовую. При изменении окраски силикагеля во флаконе диски для использования непригодны. Флаконы с дисками, используемые при повседневной работе, можно хранить в холодильнике при температуре 4-8 °С.

Расплавленную питательную среду (агар Мюллера-Хинтона) разливают в чашки Петри. Толщина слоя агара в чашке должна составлять $4,0 \pm 0,5$ мм, что достигается при внесении в чашку Петри диаметром 90 мм строго 20 мл агара. Перед посевом чашки со средой досушивают в термостате, проконтролировав отсутствие конденсата жидкости на внутренней поверхности крышек.

Бактериальную взвесь, приготовленную из суточной культуры и содержащую примерно 10^9 КОЕ/мл, наносят пипеткой на поверхность чашки Петри с питательной средой в объеме 1 мл, равномерно распределяют по поверхности покачиванием, после чего удаляют избыток инокулюма пипеткой. После инокуляции на поверхность питательной среды наносят диски с антибиотиками с помощью стерильного пинцета. Расстояние от диска до края чашки и между дисками должно быть 15-20 мм. Диски должны равномерно контактировать с поверхностью агара, для чего их следует аккуратно прижать пинцетом.

Непосредственно после аппликации дисков чашки Петри инкубируют в термостате при температуре 37 °С в течение 18-24 ч. Учет результатов проводят после инкубации, измеряя диаметр зон задержки роста тестируемого микроорганизма с помощью штангенциркуля или линейки (рис. 4). Отсутствие зоны задержки роста микроорганизмов вокруг диска указывает на устойчивость исследуемой культуры к данному антибиотику. При зоне задержки роста до 14 мм говорят о малой чувствительности к антибиотику, от 15 до 25 мм – о достаточной чувствительности, свыше 25 мм – о высокой чувствительности.

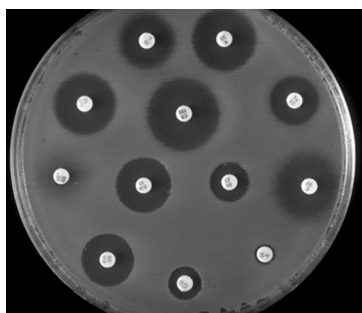


Рис. 4. Определение антибиотикочувствительности

Постановка серологических реакций

Методика постановки РА в пробирках. Готовят ряд последовательных разведений сыворотки крови, на изотоническом растворе NaCl, добавляют антиген в рабочем разведении. Параллельно ставят контроль антигена (табл. 1).

Пробирки помещают в термостат при температуре 37 °С на 18-20 часов.

Реакция оценивается визуально в крестах:

++++ – полная агглютинация (на дне пробирки осадок, который при встряхивании разбивается с образованием хлопьев, жидкость остается прозрачной, агглютинировало 100% антигена);

+++ – частичная агглютинация (неполная агглютинация с хорошо выраженным осадком и со слабой опалесценцией жидкости, агглютинировало 75% антигена) (рис. 5);

++ – частичная агглютинация с небольшим осадком (надосадочная жидкость мутная, агглютинировало 50 % антигена);

+ – очень небольшой осадок (жидкость непрозрачная, агглютинировало 25 % антигена);

- – отсутствие агглютинации (осадка нет, жидкость мутная).

Таблица 1

Схема постановки РА для обнаружения антител в сыворотке крови

Компоненты реакции	Количество компонентов (мл) в пробирке					
	1 (исходное разведение и контроль сыворотки)	2	3	4	5	6 (контроль антигена)
0,85% раствор NaCl	2,4	-	0,5	0,5	0,5	0,5
Исследуемая сыворотка	0,1	0,5 из 1-ой проб.	0,5 из 1-ой проб.	0,5 из 3-ей проб.	0,5 из 4-ой проб.*	-
Полученное разведение	1:25	1:25	1:50	1:100	1:200	
Антиген в рабочем разведении	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Конечное разведение	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	
	Перемешивают встряхиванием. Инкубируют при 37-38 °С 18-20 ч					

Примечание: * из 5-й пробирки удалить 0,5 мл

За титр антител в исследуемой сыворотке принимают последнее разведение, в котором наблюдается агглютинация минимум на два креста.

РА чувствительна и специфична, однако уступает другим серологическим реакциям (преципитации, связывания комплемента и т. д.). Повысить специфичность и чувствительность реакции можно путем разведения исследуемой сыворотки до ее титра или половины титра.

Кольцевая реакция с молоком (КР) основана на взаимодействии антигена и антител, содержащихся в молоке с образованием комплекса, который осаждается на капельках жира и при отстаивании всплывает вверх, образуя синее кольцо (поскольку антиген – клетки бруцелл окрашены гематоксилином). Кольцевую реакцию с молоком применяют для проверки благополучия по бруцеллезу коров и молока на рынке.

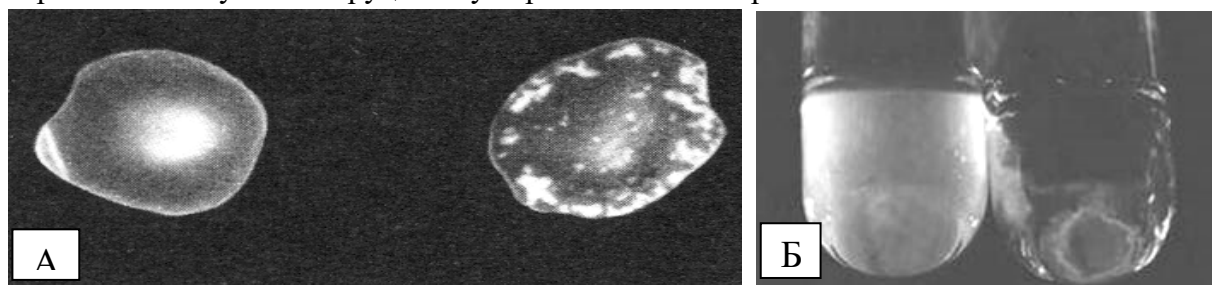


Рис. 5. Положительная РА на стекле (А) и в пробирках (+++ и +++) (Б)

Компоненты реакции: исследуемое молоко; антиген цветной бруцеллезный для кольцевой реакции с молоком, который представляет собой стандартизованную взвесь убитых бруцелл, окрашенных гематоксилином в синий цвет; сыворотка позитивная бруцеллезная.

Постановка КР с молоком. В бактериологическую пробирку вносят 2 мл молока и добавляют 0,1 мл антигена, пробирки встряхивают и помещают в водяную баню при 37-38 °С, через 45-60 минут учитывают результат. Реакция оценивается в крестах:

+++ – четко выраженное синее кольцо в верхней части столбика молока в слое сливок, молоко белое;

++ – достаточно выраженное синее кольцо в слое сливок, остальная часть молока имеет синеватый цвет;

+ – синее кольцо в слое сливок выражено слабо, столбик молока имеет синий цвет;

- – столбик молока равномерно окрашен в синий цвет, слой сливок белого или желтоватого цвета.

Реакция считается положительной, если оценивается на 3 и 2 креста, сомнительной – на один крест, отрицательной – если нет реакции.

Реакция кольцепреципитации ставится в пробирке. На иммунную сыворотку наслаивают растворимый антиген, при оптимальном соотношении антигена и антител на границе этих двух растворов образуется непрозрачное кольцо преципитата. Если в качестве антигена используют прокипяченные и профильтрованные экстракты тканей, то такая реакция называется термопреципитации. Реакция термопреципитации применяется для диагностики сибирской язвы (реакция Асколи).

Методика постановки РКП. Различают следующие варианты постановки этой реакции: 1) метод «наслаивания» антигена; 2) метод «подслаивания» антител; 3) микровариант.

Метод «наслаивания» антигена. В пробирки Уленгута с помощью тонкой пастеровской пипетки, не смачивая стенок пробирки, вносят 0,3-0,4 мл иммунной сыворотки. На поверхность сыворотки по стенке осторожно наслаивают 0,1-0,2 мл исследуемого антигена (экстракт). Поскольку плотность сыворотки и экстракта различна, то смешивание ком-

понентов не происходит. Учет реакции проводят через 1-2 мин на фоне темной бумаги. При положительной реакции на границе контакта компонентов происходит помутнение среды, образование преципитата, видимого сбоку как серо-белый диск (рис. 44).

Метод «подслаивания» антител. В пробирку вносят антиген, а затем при помощи пастеровской пипетки на дно пробирки подслаивают иммунную сыворотку.

Сущность двойной диффузии по Оухтерлони или реакции диффузионной преципитации (РДП) заключается в том, что специфические антигены и антитела диффундируют в агаровом геле из мест локализации навстречу друг другу и, взаимодействуя, образуют полосы преципитации (комплекс: антиген + антитело), которые хорошо заметны на фоне прозрачного геля. Для РДП используется высокоочищенный агар фирмы «Дифко», из которого готовится 1,5%-й раствор (рН 7,2-7,4) с добавлением мертиолата (конечное разведение 1:10 000) как консерванта. Агаровый гель наносят на стекло толщиной 3-4 мм, в нем, после застывания, вырезают лунки диаметром 4-5 мм на расстоянии друг от друга 3-4 мм, по специальному трафарету, создают дно лунок (пронося стекло над пламенем спиртовки). В одну лунку вносят взвесь, содержащую антиген, а в другую – сыворотку, содержащую антитела, создают условия влажной камеры и помещают в термостат. Антигены и антитела диффундируют навстречу друг другу, вступают в иммунную реакцию и образуют линии преципитации. У многокомпонентных систем между лунками с антигенами и антителами появляется несколько линий преципитата; у идентичных антигенов линии преципитата сливаются, у неидентичных – пересекаются (рис. 6).

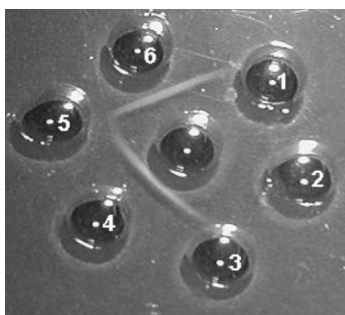


Рис. 6. Положительная реакция РДП

В основе иммуноферментного анализа (ИФА) лежит присоединение к антителам ферментной метки, что позволяет учитывать результат реакции антиген-антитело по появлению ферментативной активности или по изменению ее уровня.

К сегодняшнему дню предложены десятки вариантов реакций, основанных на указанном принципе, но наиболее широкое распространение в диагностике инфекционных заболеваний получил твердофазный гетерогенный иммунный анализ – ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*). Чаще всего для его осуществления применяют 96-луночные полистирольные планшеты, так как на полистироле можно легко адсорбировать антитела, а с помощью специальной обработки, и различные антигены.

В случае применения ИФА для поиска антигена, на стенках лунок адсорбируют соответствующие антитела. Исследуемый материал вносят в лунку, при этом антиген, взаимодействуя с антителами, фиксируется в ней. Лунки тщательно промывают буферным раствором, чтобы удалить не адсорбировавшиеся вещества. Затем вносят антитела против искомого антигена, меченные ферментом (конъюгат). При формировании конъюгата подбирают такой оптимальный метод введения ферментной метки, чтобы оба компонента конъюгата сохраняли свою биологическую активность: фермент – способность взаимодействовать с субстратом, а антиген или антитело – антигенность и антигенсвязывающую активность, соответственно. В ИФА может использоваться не менее 15 различных ферментов. Наибольшее применение нашли пероксидаза хрена (ПХ), щелочная фосфатаза (ЩФ) и β -D-галактозидаза.

После инкубации лунку снова промывают, чтобы удалить избыток меченых антител, если они не удерживаются комплексом антиген-антитело, образовавшемся на предыдущем этапе.

На заключительном этапе в лунки вносят хромогенный субстрат, который, разрушаясь, образует окрашенное вещество или хромоген и субстрат (например, тетраметилбензидин (ТМБ) и перекись водорода). Ферментативное расщепление субстрата приводит к распаду перекиси водорода до воды и кислорода. Последний окисляет хромоген, который из бесцветного становится голубым. Для остановки ферментативной реакции вносят в лунки планшета стоп-реагент (5% раствор H_2SO_4), после чего содержимое лунок приобретает желтый цвет. Таким образом, изменение окраски содержимого лунки будет свидетельствовать о положительном результате реакции: взаимодействие антиген – антитело имело место.

Измеряя оптическую плотность жидкости в лунке и сравнивая ее с контролем, можно легко определить концентрацию искомого компонента. В этом случае для учета результатов используют специальные приборы «ридеры», представляющие по своей сути спектрофотометры с вертикальным ходом луча, специально приспособленные для работы со стандартными полистироловыми планшетами.

Определение персистентных свойств микроорганизмов, являющихся системообразующими факторами микросимбиоза (биоплёнокообразование, антилизоцимная активность)

Способность микроорганизмов образовывать биоплёнки определяют фотометрически по методике G. O'Toole et al. (2000).

Биомассу исследуемых культур стандартной бактериологической петлёй засевают в 4 мл питательного бульона и культивируют в термостате при температуре $37^{\circ}C$ в течение 18-24 ч. Затем готовят разведения стерильным бульоном 1:100 и разносят по лункам микропланшета. После инкубации планктонные микроорганизмы удаляют из каждой лунки и промывают лунки дистиллированной водой. Затем вносят по 125 мкл 0,1%-ного раствора кристаллического фиолетового, окрашивают в течение 10 минут при комнатной температуре. Далее раствор удаляют и промывают лунки дистиллированной водой. Планшет высушивают на воздухе и в каждую лунку вносят по 200 мкл 95%-ного этилового спирта, инкубируют в течение 10-15 минут при комнатной температуре, а затем по 125 мкл полученной спиртовой вытяжки переносят в чистый 96-луночный полипропиленовый планшет и измеряют оптическую плотность (А) на спектрофотометре STATFAX 2100 (длина волны 492 нм). Коэффициент биоплёнокообразования (КБ) рассчитывают по формуле (1):

$$KB = \frac{A_{492\text{опыт}}}{A_{492\text{контроль}}}, \quad (1)$$

где КБ – коэффициент биоплёнокообразования, усл. ед.;

$A_{492\text{опыт}}$ – оптическая плотность вытяжки в опыте, ед. ОП;

$A_{492\text{контроль}}$ – оптическая плотность вытяжки в контроле, ед. ОП.

Положительным результатом считают значения более 1,1.

Антилизоцимную активность определяют по методике О.В. Бухарина с соавторами (1997) фотометрическим методом. Микробную массу исследуемых культур стандартной бактериологической петлёй засевают в 3 мл жидкой питательной среды и культивируют в термостате в течение 24 часов. На спектрофотометре STATFAX 2100 (длина волны 492 нм) измеряют оптическую плотность бульонной культуры против питательного бульона. Супернатант отделяют от бактериальных клеток центрифугированием в течение 15 минут при 3000 об/мин. Для определения АЛА в качестве тест-штамма используют суточную агаровую культуру *M. luteus* ATTC 15307. Выросшие бактериальные клетки тест-штамма убивают хлороформом в течение 60 минут, смывают, фильтруют через крупнопористый фильтр, дважды отмывают 1/15 М фосфатным буфером с трилоном Б и один раз 1/15 М фосфатным буфером (рН=6,2), после чего оптическую плотность суспензии микрококка

доводят до 0,300. На 1/15 М фосфатном буфере (рН=6,2) готовят раствор лизоцима (BioChemoka, Fluka) с концентрацией 20 мкг/мл. Супернатант исследуемых культур микроорганизмов объемом 0,9 мл смешивают с 0,1 мл приготовленного раствора лизоцима и инкубируют 60-120 минут при температуре 37 °С. 0,5 мл смеси супернатанта и лизоцима добавляют к 2 мл суспензии тест-штамма микрококка и измеряют оптическую плотность полученной смеси через 30 и 150 с на спектрофотометре STATFAX 2100 (длина волны 492 нм) против 1/15 М фосфатного буфера. В качестве контроля используют смесь питательного бульона с лизоцимом в соотношении 9:1. По степени лизиса суспензии тест-культуры рассчитывают антилизоцимную активность исследуемой культуры по формуле (2):

$$A = \frac{V_1 C \cdot \left(1 - \frac{\Delta D_o}{\Delta D_k}\right)}{V_2 Y}, \quad (2)$$

где А – антилизоцимная активность, мкг инактивированного лизоцима / мл супернатанта;

V_1 – объем раствора лизоцима исходной концентрации, мл;

V_2 – объем супернатанта бульонной культуры исследуемого штамма, мл;

C – исходная концентрация лизоцима, мкг/мл;

Y – оптическая плотность бульонной культуры исследуемого штамма, ед. ОП;

ΔD_o – изменение оптической плотности суспензии тест-культуры в опыте между 30 и 150 с, ед. ОП;

ΔD_k – изменение оптической плотности суспензии тест-культуры в контроле между 30 и 150 с, ед. ОП.

Оценка антимикробной активности веществ животного и бактериального происхождения методом микротитрования в бульоне

Одним из методов определения антимикробной активности веществ является метод микротитрования в бульоне (Wiegand I. et al., 2008). Для этого тестируемое соединение суспендируют в растворителе (водный раствор ДМСО, изотонический раствор хлорида натрия и т.д.) и готовят серийные двукратные разведения в лунках стерильного 96-луночного полипропиленового планшета. Тест-культуры выращивают в течение 18 часов при 37 °С на агаре Мюллера-Хинтона (HiMedia, Индия).

Из тест-культур готовят взвеси, содержащие $2-7 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. По 100 мкл бактериальной суспензии вносят в лунки 96-луночного полипропиленового планшета с первого по одиннадцатый ряд и добавляют по 11 мкл двукратных разведений тестируемых пептидов в каждую лунку с первого по десятый ряд. В лунки одиннадцатого ряда, который служит контролем роста культуры, добавляют 11 мкл растворителя. В двенадцатый ряд планшета вносят стерильный Мюллер-Хинтон бульон (HiMedia, Индия) в качестве контроля стерильности и бланка для сканирования ячеек. Планшеты инкубируют в термостате. Через 24 часа инкубирования высевает по 10 мкл из содержимого опытных лунок планшета, где отсутствует видимый рост микроорганизмов, и из контрольных лунок на Мюллер-Хинтон агар. Учитывают количество выросших колоний. За минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) принимают концентрацию вещества, полностью предотвращающую формирование колоний. За минимальную подавляющую концентрацию (МПК) принимают концентрацию вещества, подавляющую рост 50% микроорганизмов по сравнению с контролем.

4.3. Заключительный

Основным документом, отображающим всю практическую деятельность студента-практиканта, является отчёт. В период учебной практики он ежедневно делает записи о том, что он изучал, в чём принимал участие или, что выполнил самостоятельно за день. Оформление отчёта по практике (приложение 1).

Все запланированные мероприятия студент-практикант осуществляет под руководством руководителя практики, который пишет рецензию на учебную практику (приложение 2).

5. Примерный перечень вариантов индивидуальных заданий на практику

1. изготовить 10 ватно-марлевых пробок для пробирок,
2. изготовить 6 пастеровских пипеток,
3. помыть чистую лабораторную посуду,
4. помыть использованную лабораторную посуду,
5. смонтировать по 5 единиц разных видов лабораторной посуды для проведения стерилизации,
6. провести стерилизацию металлического инструментария методом кипячения,
7. провести стерилизацию смонтированной лабораторной посуды в сухожаровом шкафу.
8. приготовить спиртовые растворы кристаллического фиолетового и фуксина.
9. подготовить бумажки по Синёву,
10. приготовить МПБ, МПА и среду Эндо,
11. приготовить мазки из культур и окрасить их по Граму, определить морфологию бактерий,
12. осуществить посев на жидкие и плотные питательные среды.
13. описать культуральные свойства микроорганизмов, выросших на жидких и плотных питательных средах.
14. провести отбор проб воздуха аспирационным и седиментационным способом, определить ОМЧ,
15. провести отбор проб воды из водопровода и открытого водного источника аспирационным и седиментационным способом, определить ОМЧ, коли-титр,
16. провести отбор проб почвы, определить ОМЧ.
17. выделить чистую культуру микроорганизмов с использованием методов, основанных на механическом разобщении клеток;
18. выделить чистую культуру микроорганизмов с использованием методов, основанных на биологических свойствах микроорганизмов,
19. осуществить идентификацию чистых культур микроорганизмов с помощью коммерческих тест-систем и сред Гисса,
20. провести идентификацию микроорганизмов с помощью метода ПЦР, основанную на обнаружении генов, кодирующих супероксиддисмутазу;
21. охарактеризовать спектр антибиотикорезистентности культур микроорганизмов,
22. осуществить постановку серологических реакций (РА в пробирках, РБП, РДП, РСК, ИФА),
23. оценить распространённость и выраженность антилизосимной и биоплёнкообразующей способности микроорганизмов фотометрическим методом;
24. изучить антимикробную активность веществ животного и бактериального происхождения методом микротитрования в бульоне.

6. Учебно-методическое и информационное обеспечение практики

6.1 Основная литература:

1. Госманов Р.Г. Практикум по ветеринарной микробиологии и микологии [Электронный ресурс]: учеб. пособие /Р.Г. Госманов, Н.М. Колычев, А.А. Барсков. – СПб.: Издательство «Лань», 2014. – 384с. -ЭБС «Лань».

2. Колычев Н.М. Ветеринарная микробиология и микология [Электронный ресурс] : учеб./Н.М. Колычев, Р.Г. Госманов. –СПб.: Издательство«Лань», 2014. - 624 с. -ЭБС «Лань».

3. Краткий словарь микробиологических, вирусологических, иммунологических и эпизоотологических терминов [Электронный ресурс]: /Р.Г. Госманов [и др.]. – СПб.: Издательство «Лань», 2017. - 304 с.–ЭБС «Лань».

6.2 Дополнительная учебная литература

1. Госманов Р.Г. Микробиология и иммунология [Электронный ресурс]: учеб. пособие / Р.Г. Госманов, А.И. Ибрагимова, А.К. Галиуллин. – СПб.:Издательство «Лань», 2013. - 240 с.-ЭБС «Лань».

2. Кисленко В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология. Практикум: Учебное пособие. – СПб.: Издательство «Лань», 2015.- 320 с. ЭБС. «Лань».

3. Савина И.В. Основы ветеринарной микробиологии, микологии, вирусологии и иммунологии: учебное пособие / И.В.Савина, Р.М.Нургалиева, О.Л.Карташова, Е.Ю.Исайкина. – Оренбург: Издательский центр ОГАУ, 2015. - 253 с.

6.3 Программное обеспечение и информационные справочные системы Open Office.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ**

«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Факультет ветеринарной медицины

Кафедра микробиологии и заразных болезней

ОТЧЕТ ПО УЧЕБНОЙ ПРАКТИКЕ

Исполнитель

студент гр. _____ Ф.И.О.

дата

подпись

Курс 1

Направление подготовки 06.04.01 Биология

Оренбург 202.. г.

РЕЦЕНЗИЯ

на материалы учебной практики

Студента _____

Рецензент _____

№	Критерии оценок	Баллы
1	Посещаемость	10
2.	Активность при выполнении заданий практики	30
3.	Полнота представленного в отчёте материала, его соответствие программе практики	25
3	Качество оформления отчета	10
4	Своевременное представление отчета	5
5	Защита отчёта (доклад и ответы на вопросы)	20
	ИТОГО	100

Комментарии: _____

Рецензент _____ « ____ » _____ 201__ г.

Форма индивидуального задания на практику

ФГБОУ ВО «ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Индивидуальное задание на учебную практику

На студента(ку) _____

(Ф.И.О. полностью, № группы)

Факультет ветеринарной медицины

Кафедра микробиологии и заразных болезней

Срок прохождения практики с _____ по _____

Содержание задания на практику (перечень подлежащих рассмотрению вопросов):

Цель: _____

Индивидуальное задание:

Подпись руководителя практики от кафедры: _____ Ф.И.О.

« ____ » _____ 20 ____ г.

Ознакомлен _____

« ____ » _____ 20 ____ г.

(подпись студента)

Отметка о выполнении индивидуального задания

_____ -

Подпись руководителя практики _____ Ф.И.О.