



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Тюменский научный центр
Сибирского отделения Российской академии наук
(ТюмНЦ СО РАН)

СТАНДАРТНЫЕ ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ

СОП № 002 / 01 ММП

Контроля качества единиц хранения почвенные микроорганизмов
многолетнемерзлых пород Арктики – ПМММПА



УТВЕРЖДАЮ:

Председатель ТюмНЦ СО РАН

В.П. Мельников


«20» апреля 2005г.

СТАНДАРТ ОПЕРАЦИОННОЙ ПРОЦЕДУРЫ
для контроля качества единиц хранения почвенные микроорганизмов
многолетнемерзлых пород Арктики – ПМММПА
СОП № 002 / 01 ММП

Рассмотрено на Ученом совете
Протокол № 3 от «20» 04 2005г.
Секретарь Ученого совета

Е.В. Устинова

	Должность	Фамилия/Подпись	Дата
Разработал	Руководитель отдела биоресурсов криосферы	Петров С.А./	
Проверил	Инженер по охране труда	Шилингас В.И./	
Согласовал	Заместитель Председателя ТюмНЦ СО РАН по научной работе	Мальчевский В.А./	

	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тюменский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук (ТюмНЦ СО РАН)
	СТАНДАРТНЫЕ ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ
СОП № 002 / 01 ММП	Контроля качества единиц хранения почвенные микроорганизмы многолетнемерзлых пород Арктики – ПМММПА

1. Область применения

Настоящий документ является методической базой для осуществления контроля качества единиц хранения почвенные микроорганизмы многолетнемерзлых пород Арктики – ПМММПА. Документ предназначен для коллекционной деятельности, связанная с использованием почвенные микроорганизмы многолетнемерзлых пород Арктики (ПМММПА) на базе ЦКП «Биокосные системы криосферы» Федерального государственного учреждения науки Тюменского научного центра Сибирского отделения Российской академии наук (далее – ТюмНЦ СО РАН).

2. Нормативная ссылка


- 1.1. Санитарно-эпидемиологические правила и нормы. СанПиН 2.1.7.1287-03.
- 1.2. ГОСТ 17.4.3.01-83. Общие требования к отбору проб почвы.
- 1.3. ГОСТ 17.4.4.02-84. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа.
- 1.4. МУ 2.1.7.730-99. Гигиеническая оценка качества почвы населенных мест.
- 1.5. МУ по санитарно-микробиологическому анализу лечебных грязей № 143-9/316-17.
- 1.6. МУК 4.2.1018-01. Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды.

3. Санитарно-бактериологические показатели многолетнемерзлых почв и их нормирование

Санитарное состояние многолетнемерзлых почв – совокупность физико-химических, биологических свойств почвы, определяющих качество и степень ее безопасности в эпидемическом и гигиеническом отношении. Отмечена тенденция изменения численности микроорганизмов в многолетнемерзлых почвах в зависимости от содержания органики, влажности в мерзлых отложениях грунта и от температуры культивирования (таблица 1).

Таблица 1 – Численность микроорганизмов из проб скважин при различной температуре культивирования, КОЕ/г

№ скважины	Глубина, м	Численность микроорганизмов		
		+5 ⁰ С	+16 ⁰ С	+36 ⁰ С
1	2,5	-	1,5*10 ⁵	2,0*10 ⁴
1	10,1	-	2,5*10 ⁵	1,0*10 ⁵
1	10,5	-	2,6*10 ⁶	-
1	20	-	5,5*10 ⁷	2,1*10 ⁷
1	30,3	-	1,07*10 ⁷	1,44*10 ⁷
2	1,5	-	1,62*10 ⁷	1,44*10 ⁷
2	2,5	-	1,71*10 ⁸	1,73*10 ⁸
2	4,2	-	1,4*10 ⁴	1,6*10 ⁴
2	10,1	-	2,1*10 ⁵	2,2*10 ⁵
2	10,5	-	2,3*10 ⁵	2,2*10 ⁵
2	12,3	-	2,0*10 ⁶	-
2	20	-	3,9*10 ⁵	1,8*10 ⁷
2	30,2	-	5,4*10 ⁶	2,0*10 ⁴

	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тюменский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук (ТюмНЦ СО РАН)
	СТАНДАРТНЫЕ ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ
СОП № 002 / 01 ММП	Контроля качества единиц хранения почвенные микроорганизмы многолетнемерзлых пород Арктики – ПМММПА

Так в скважине №1, содержание органических веществ и содержание влаги с глубиной увеличивается, и соответственно численность бактерий тоже. Наиболее заселенным оказался образец из оторфованной глины с глубины 20 м. При температуре -1,4⁰С, влажность в грунте на данной глубине характеризовалась как средняя, при такой влажности микроорганизмы могут развиваться.

Оценка санитарного состояния почвы проводится по результатам анализов почв по санитарно-бактериологическим показателям, которые делятся на косвенные и прямые:

1) Косвенные характеризуют интенсивность биологической нагрузки на почву. Это - санитарно-показательные микроорганизмы: бактерии группы кишечной палочки (общие колиформные бактерии) и энтерококки. В многолетнемерзлых породах биологическая нагрузка на почву не велика и, как следствие, невысоки индексы санитарно-показательных микроорганизмов, что наряду с санитарно-химическими показателями (динамика аммиака и нитратов, санитарное число) свидетельствует о благополучии и низкого риска инфицирования (таблица 2).

Таблица 2 – Степень опасности и загрязнения почвы

Показатель	Степень опасности и загрязнения почвы			
	Б. Ч	ОБ. СЗ	О.З	ЧО. СЗ
Коли-титр	> 1	1-0.01	0,009-0.001	< 0.001
Титр анаэробов	>0.1	0,1-0,001	0,0009-0.0001	< 0.0001
Число яиц гельминтов в 1 кг	нет	1-10	11-100	> 100
Число личинок и куколок мух на 25 см	нет	1-10	11-100	> 100
Санитарное число	0,98-1	0.85-0.47	0,75-0,84	< 0,75
Кратность превышения ПДК по экзогенным химическим веществам	1	2-10	11-100	> 100

2) Прямые санитарно-бактериологические показатели эпидемической опасности почвы - обнаружение возбудителей кишечных инфекций (патогенные энтеробактерии, энтеровирусы). Почву оценивают как «чистую» без ограничений по санитарно-бактериологическим показателям при отсутствии патогенных бактерий и индексе санитарно-показательных микроорганизмов до 10 клеток на 1 г почвы. О возможности загрязнения почвы патогенными энтеробактериями свидетельствует индекс санитарно-показательных микроорганизмов БГКП (колиформ) и энтерококков 10 и более клеток/г почвы (таблица 3).

При необходимости углубленной оценки санитарного состояния почвы исследуются показатели биологической активности почвы. Основными интегральными показателями биологической активности почвы являются: общая микробная численность (ОМЧ), клостридии, термофильные бактерии, грибы и актиномицеты, аммонификаторы, аэробные целлюлозные микроорганизмы и т.д.

Перечень показателей определяется целями исследования, природой и интенсивностью загрязнения, характером землепользования.


	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тюменский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук (ТюмНЦ СО РАН)
	СТАНДАРТНЫЕ ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ
СОП № 002 / 01 ММП	Контроля качества единиц хранения почвенные микроорганизмов многолетнемерзлых пород Арктики – ПМММПА

Таблица 3 – Характеристика категорий загрязнения почв.

Категория загрязнения почв	Индекс БГКП	Индекс энтерококков	Патогенные энтеробактерии	Яйца гельминтов, в том числе личинки экз/кг	Куколки мух в почве с площадью 20 × 20 см
Чистая	1–10	1–10	0	0	0
Умеренно опасная	10–100	10–100	0	до 10	К – отс.
Опасная	200–1000	100–1000	0	до 100	К – до 10
Чрезвычайно опасная	1000 и выше	1000 и выше	0	>100	К – >10


4. Отбор проб

Места отбора проб предварительно отмечаются на картосхеме. Отбор проб осуществляется согласно ГОСТ 17.4.4.01-83 «Общие требования к отбору проб почвы»; ГОСТ 17.4.4.02-84 «Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа». Территория забора микроорганизмов многолетнемерзлых почв описывается с указанием адреса, точки отбора, общего рельефа микрорайона, расположения мест отбора, растительного покрова, характера землепользования, уровня грунтовых вод, типа почвы и других данных, необходимых для правильной оценки и трактовки результатов анализов образцов.

Образцы для микробиологических исследований отобраны по стандартной методике. В асептических условиях из центральной части образца отбирали пробы для микробиологических исследований. Образцы хранили в холодильнике в диапазоне температур от – 5 до – 15⁰С. Из проб мерзлых отложений грунта готовили навеску (1,0 г), которую вносили в колбу со стерильной водой (9,0 мл), и тщательно встряхивали в течение 10 мин. Из отсевшейся почвенной суспензии готовиться разведения (1:1000, 1:10000, 1:100000) и делали из них высевы заливкой на чашки Петри с мясопептонным и картофельно-глюкозным агаром. Посевы выращивали в течение 72 часов в термостате при трёх температурах: T=+36,0° С, +16,0° С и +5,0° С. По стандартным методикам определяли значения КОЕ в 1,0 г пробы, антибиотикочувствительность, антагонистические свойства выделенных штаммов бактерий.

Пробы почвы, предназначенные для бактериологического анализа, в целях предотвращения их вторичного загрязнения следует отбирать с соблюдением правил асептики: отбирают стерильными инструментами, перемешивают на стерильной поверхности, помещая в стерильную тару.

Отобранные пробы необходимо пронумеровать и зарегистрировать в журнале, указав следующие данные: порядковый номер и место взятия пробы, рельеф местности, тип почвы, целевое назначение территории, вид загрязнения, дату отбора. Пробы должны иметь этикетку с указанием места и даты отбора пробы, номера почвенного разреза, почвенной разности, горизонта и глубины взятия пробы, фамилии исследователя.

	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тюменский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук (ТюмНЦ СО РАН)
СОП № 002 / 01 ММП	СТАНДАРТНЫЕ ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ Контроля качества единиц хранения почвенные микроорганизмы многолетнемерзлых пород Арктики – ПМММПА

5. Оборудование, расходные материалы, реактивы, питательные среды

- Термостат для температурного режима (37 ± 1) °С
- Баня водяная с подогревом до температуры 100 ± 2 °С
- Прибор для мембранной фильтрации под вакуумом и устройство для создания разрежения (0,5 - 1,0) атм.
- Весы лабораторные с наибольшим пределом взвешивания до 1000 г и допустимой погрешностью 10 мг - ГОСТ 24104
- Термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 до 100 °С с ценой деления шкалы 0,5 °С
- РН-метр, обеспечивающий измерение с погрешностью до 0,01
- Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды - ГОСТ 6709
- Стерилизатор суховоздушный для температурного режима (180 ± 5) °С
- Автоклав или стерилизатор паровой - ГОСТ 19569
- Холодильник, позволяющий поддерживать температуру +2 - 4 °С
- Облучатель бактерицидный
- Горелка газовая или спиртовая
- Петли бактериологические
- Пинцеты для работы с мембранными фильтрами
- Пипетки градуированные 1-го и 2-го классов точности вместимостью 1 см³, 5 см³, 10 см³ - ГОСТ 29227
- Пробирки ГОСТ 25336-82
- Чашки бактериологические (Петри) - ГОСТ 23932-90


Допускаются к использованию коммерческие, питательные среды, диагностические препараты и системы идентификации отечественного производства, а также зарубежных фирм, предназначенные для целей описываемых методов. Питательные среды и биологические препараты зарубежного производства должны иметь международный сертификат качества ISO 9000 или EN 29000. При использовании следует руководствоваться рекомендациями фирмы-производителя.

6. Показатели биологической активности почвы

Основными интегральными показателями биологической активности являются: общая микробная численность (ОМЧ), определение актиномицетов, аммонификаторов, нитрификаторов и др.

Определение общей численности почвенных микроорганизмов (ОМЧ)

Для более полного учета общей численности сапрофитных микроорганизмов диспергирование и десорбцию клеток с поверхности почвенных частиц рекомендуется проводить следующим способом. Навеску почвы, используемую для приготовления первого разведения, доводят путем добавления небольшого количества стерильной водопроводной воды до пастообразного состояния, растирают в течение 5 минут. Затем готовят первое разведение (1:10), т.е. 101 почвы на стерильной водопроводной воде, и почвенная суспензия охлаждается при 5 - 7 °С в течение 20 - 30 мин., затем производят раститровку суспензии обычным способом. Из каждого разведения делают посев не менее двух объемов по 0,1 или 0,2 см³ на поверхность почвенного агара, разлитого в стерильные

	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тюменский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук (ТюмНЦ СО РАН)
СОП № 002 / 01 ММП	СТАНДАРТНЫЕ ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ Контроля качества единиц хранения почвенные микроорганизмов многолетнемерзлых пород Арктики – ПМММПА

чашки Петри, и равномерно шпателем растирают по всей поверхности чашки. Термостатирование засеянных чашек ведут при (28 - 30) °С в течение 72 ч. Учет результата: количество колоний на обеих чашках суммируют, делят на два и умножают на степень разведения. Результат выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ в 1 г почвы).

Определение количества актиномицетов и грибов в почве

Актиномицеты (греч. Actis - луч, micos - гриб) - одноклеточные микроорганизмы, тело состоит из нетитрованного мицелия, который имеет вид ветвящихся тонких нитей. У актиномицетов, как и у бактерий, генетическую функцию выполняет нуклеоид. В нитях мицелия находятся зерна хроматина. Размножаются актиномицеты при помощи специальных органов плодоношения, путем прорастания спор, прикрепленных на спороносцах, простым делением, перешнурованием и почкованием.


Актиномицеты - факультативные анаэробы, хорошо развиваются при t 25 - 30 °С (оптимальная температура 35 - 37 °С) на плотных средах. Одни виды растут с образованием плотных гладких колоний, другие имеют складчатые, бугристые, корковидные, бархатистые, пушистые или мучнистые колонии, которые срастаются со средой и с трудом снимаются петлей. Актиномицеты могут быть бесцветными или пигментированными (синие, фиолетовые, красные, желтые, оранжевые, зеленые и т.д.), на плотных питательных средах часто образуют воздушный мицелий, на концах которого развиваются споры, придающие колониям определенный цвет.

Грибы. Среди грибов встречаются сапрофиты и паразиты.

Наибольшее значение для медицины представляют оомицеты (Oomycetus), аскомицеты (Ascomycetes), базидиомицеты (Basidiomycetes), дейтеромицеты (Deuteromycetes), форма клеток у молодых культур может быть круглая, яйцевидная или удлиненная, у зрелых клеток - грушевидная, булабовидная, веретенообразная, амебовидная. Основным структурным компонентом клеток грибов является мицелий, состоящий из разветвленных бесцветных нитей (гиф). У одних видов он состоит из нерасчлененной клетки (mucor), у других (высших грибов) он многоклеточный; у дрожжеподобных грибов (Candida) имеется псевдомицелий.

Установлена большая чувствительность почвенных актиномицетов и грибов к действию отдельных химических веществ по сравнению с почвенными спорными и неспорными бактериями. Несомненно, что такая разбалансировка равновесия в почвенном микробиоценозе должна рассматриваться как отрицательное явление. Актиномицетам и грибам принадлежит большая роль в превращении широкого круга органических и минеральных веществ. Благодаря чрезвычайно выраженным антагонистическим и токсическим свойствам они оказывают большое влияние на формирование микробных почвенных биоценозов, являются продуцентами многих физиологических активных веществ: аминокислот, ферментов, витаминов.

Для учета почвенных актиномицетов и грибов используются те же разведения почвенной суспензии, что и при учете общей численности микроорганизмов. Как правило, для учета почвенных грибов используют разведение почвенной суспензии 1:10 - 1:100, то есть 10¹ - 10³, а при учете актиномицетов - 1:100 - 1:10000 (от 10³ до 10⁵). Посев производят поверхностным способом, нанося на агаризованные среды 0,1 - 0,05 см³ суспензии. Для учета актиномицетов используется чаще всего крахмало-аммиачный агар

	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тюменский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук (ТюмНЦ СО РАН)
	СТАНДАРТНЫЕ ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ
СОП № 002 / 01 ММП	Контроля качества единиц хранения почвенные микроорганизмы многолетнемерзлых пород Арктики – ПМММПА

или агар Ваксмана, при учете грибов - сусло-агар или минеральная среда Чапека. При учете грибов используют добавление в среду веществ, ингибирующих рост бактерий, - концентрированную молочную кислоту в количестве 4 мл/л среды. Прибавлением такого количества кислоты доводят рН среды до 4,0 - 4,5. Кислота добавляется непосредственно перед посевом в расплавленную среду. Поскольку прибавляют концентрированные кислоты, то их предварительно не стерилизуют.

Определение аммонификаторов в почве

Аммонифицирующие микроорганизмы принимают участие в расщеплении белковых соединений до аммиака. Их учитывают на мясо-пептонном агаре, а при необходимости на жидких пептонных средах (мясо-пептонный бульон, пептонная вода) с индикаторными бумажками, определяющими аммиак. Для определения выделяющегося аммиака над средой в пробирке подвешивают красную лакмусовую бумажку (при выделении аммиака она синееет) или полоски фильтровальной бумаги, пропитанные реактивом Круппа (от аммиака краснеют). При выращивании почвенных суспензий на мясо-пептонном агаре результаты выражают в КОЕ (колониеобразующих единицах) на 1 г почвы. При определении этого показателя в жидких средах определяют титр, индекс аммонифицирующих микроорганизмов по последней пробирке, в которой еще обнаруживается аммиак (на 10-е сутки) после термостатирования при температуре 25 - 30 °С.

Определение токсичности почв по отношению к микроорганизмам


Метод определения степени токсичности почв к микроорганизмам используется в качестве быстрого и достаточно чувствительного теста для получения ориентировочных данных о способности почвы самоочищаться от патогенных и санитарно-показательных микроорганизмов. Кроме того, этот тест оказался также чувствительным при определении влияния химических веществ на почвенный микробиоценоз. Низкая степень токсичности или ее снижение по отношению к патогенным микроорганизмам свидетельствует о наличии или возникновении более благоприятных условий для выживания возбудителей в таких почвах. Это явление неблагоприятное по классам:

- 1 - отсутствие - 0 - 20% токсичных образцов,
- 2 - слабо выраженная - 21 - 40% токсичных образцов,
- 3 - средняя - 41 - 60% токсичных образцов,
- 4 - сильно выраженная - 61 - 80% токсичных образцов,
- 5 - абсолютная - 81 - 100% токсичных образцов.

Для определения токсичности почв можно использовать два метода - качественный и качественно-количественный.

Качественный метод определения токсичности почв

В стерильную чашку Петри вносится 10 г перемешанной и просеянной почвы и ровным слоем распределяется на половину дна чашки. На дне и крышке чашки записывается номер пробы по журналу и тест-микроорганизм. Затем чашки переносят в бокс и устанавливают на ровной поверхности. Чашки с почвой заливают 1,5%-ным непитательным агаром в количестве около 10,0 см³ с таким расчетом, чтобы он покрыл слой почвы. После его застывания в чашки вносится питательный агар также в количестве 10 см³, адекватный тест-микроорганизмам. Из одного почвенного образца готовятся 2 параллельные чашки к каждому микроорганизму. Чашки высушивают под

	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тюменский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук (ТюмНЦ СО РАН)
	СТАНДАРТНЫЕ ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ
СОП № 002 / 01 ММП	Контроля качества единиц хранения почвенные микроорганизмы многолетнемерзлых пород Арктики – ПМММПА

бактерицидными лампами в течение 30 минут. Затем производится посев индикаторных штаммов микроорганизмов.

Посевы производятся петлей, причем движения петли всегда начинают с той части чашки, на которой помещена почва. В качестве контроля производят посевы тех же культур на аналогичные среды, но без почвы.

Посевы инкубируют в зависимости от вида индикаторного микроорганизма. Учет результатов начинается с просмотра контрольного посева. В случае равномерного роста тест-микроба на всей поверхности агаровой пластинки просматривают остальные чашки с посевами. Колонии идентифицируются по "форме роста". Кроме того, из каждой серии посевов с нескольких чашек снимают колонии и производят их идентификацию.

Рост колоний только на участке агаровой пластинки, под которой нет почвы, показывает, что исследованный почвенный образец токсичен (Т). При исследовании некоторых почвенных проб отмечается частичное ингибирование роста тест-микроба. В этих случаях регистрируется маловыраженная токсичность (М/Т).

Качественно-количественный метод определения токсичности почв


В стерильную чашку Петри также вносится 10 г почвы и распределяется равномерно по всей поверхности, затем, как и при качественном методе, вносится непитательный и питательный агар. В качестве дополнительного барьера между почвой и индикаторным штаммом на поверхности питательной среды укладывают мембранный фильтр.

На матовую поверхность мембранных фильтров простым карандашом наносятся 16 точек, после чего фильтр стерилизуют кипячением. Затем на питательную среду помещают мембранные фильтры (матовой поверхностью вверх) в количестве от 1 до 4-х на одну чашку. На поверхность фильтра в местах, отмеченных точками, производят посев бактериальной петлей (иглой) культуры индикаторного штамма, суспензированного в физиологическом растворе, содержащем около 100 млн. бактериальных клеток в 1 мл по оптическому стандарту мутности. Эта манипуляция упрощается при использовании специального штампа в виде металлического диска диаметром около 30 мм. В диск вмонтированы 16 стальных игл строго одинаковой длины и толщины. Культуры микроорганизмов наливают в чашки Петри и погружают в них кончики игл стерильного штампа, а затем одновременно производится посев в 16 точках мембранного фильтра. Посевы инкубируют в термостате или анаэроостате при оптимальной температуре и продолжительности в зависимости от физиологических особенностей индикаторного штамма.

Учет результатов производят путем подсчета выросших колоний в точках посева. Процент пророста (Р) высчитывается как количество образовавшихся колоний к количеству посевов. Токсичность определяется по формуле: $T = 100 - P$. Этим методом, как и качественным, устанавливается абсолютная токсичность, когда на фильтрах не вырастает ни одна колония; отсутствие токсичности - на местах всех посевов вырастают колонии и различная степень токсичности - когда прорастает только часть засеянных точек.

7. Определение патогенных энтеробактерий родов *Salmonella* и *Shigella* в 1 г почвы

Сущность определения шигелл и сальмонелл заключается в использовании методов накопления патогенных бактерий в средах обогащения с последующим пересевом на

	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тюменский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук (ТюмНЦ СО РАН)
СОП № 002 / 01 ММП	СТАНДАРТНЫЕ ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ Контроля качества единиц хранения почвенные микроорганизмов многолетнемерзлых пород Арктики – ПМММПА

плотные селективные и дифференциальные среды с последующим изучением биохимических свойств выделенных культур и их серологическую идентификацию по методике.

Используют не менее двух сред накопления из перечисленных: среду Мюллера Кауфмана, селенитовый бульон, магниевую среду, тетрационатовый бульон. Для сальмонелл используют любые две среды из четырех, для шигелл - селенитовую среду.

Проведение исследования аналогично исследованию на колиформы.

Посевы инкубируют при (37 ± 1 °С) в течение 18 - 24 часов, затем из каждого флакона делают высевы бактериологической петлей на чашки с плотными селективными средами: для сальмонелл - на висмут-сульфитный агар, ксилозо-лизин-дезоксихалатный агар, для шигелл на бактоагар Плоскирева, среду Эндо или ксилозо-лизин-дезоксихалатный агар. Чашки с посевами инкубируют при температуре (37 ± 1 °С) в течение 18 - 20 часов, а в случае отсутствия роста чашки с посевами оставляют еще на 24 часа в термостате. С каждой чашки снимают подозрительные на сальмонеллы и шигеллы колонии в пробирки с дифференциально-диагностическими средами. Окончательное определение биохимических и серологических свойств, био- и сероваров проводят по действующим МУ 17.04-23/307-84 «Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями».