

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

Г.А. Гаврилова, О.В. Литвиненко

МИКРОБИОЛОГИЯ

Практикум

**Благовещенск
Издательство ДальГАУ
2014**

УДК 579(075.8)

Микробиология: практикум [Текст]/ сост. Г.А. Гаврилова, О.В. Литвиненко.
– Благовещенск: ДальГАУ, 2013. – 130 с.

Практикум по микробиологии составлен в соответствии с рабочей программой по дисциплине «Микробиология». Материал включает три раздела: общая микробиология, микробиологический контроль сырья и готовой продукции, специальная микробиология. Приведены современные данные о морфологии и физиологии микроорганизмов, показаны микробиологические критерии безопасности пищевых продуктов при контроле предприятий общественного питания, по всем разделам предложены лабораторные работы, выполнение которых позволит сформировать у студентов представление о многообразии мира микроорганизмов в природе, их роли в различных технологических процессах переработки и хранения продовольственного сырья, приготовления продуктов питания, помогут понять значение микробиологического контроля при определении качества пищевой продукции.

Предназначен для студентов очной и заочной форм обучения по направлению подготовки 19.03.04.62 – Технология продукции и организация общественного питания.

Рецензенты:

Ю.Ю. Денисович,

канд.техн.наук, заведующая кафедрой технологии
продукции и организации общественного питания;

Ю.А. Гаврилов,

д-р биол. наук, профессор кафедры экологии,
почвоведения и агрохимии

Рекомендовано к изданию методическим советом технологического факультета Дальневосточного государственного аграрного университета (Протокол №3 от 29 ноября 2013 года).

Издательство ДальГАУ

2014

Раздел 1 ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Занятие 1. Организация микробиологической лаборатории. Правила работы и техника безопасности

Цель занятия. Ознакомить студентов с назначением, функцией, оборудованием микробиологической лаборатории на предприятиях пищевой промышленности, с правилами работы и техникой безопасности в учебной микробиологической лаборатории.

1.1 Организация микробиологической лаборатории

Основным направлением деятельности микробиологической лаборатории на предприятиях пищевой промышленности является контроль качества (микробиологическая чистота) сырья, упаковочных материалов, всевозможной готовой продукции. Испытание на микробиологическую чистоту включает количественное определение жизнеспособных бактерий и грибов, а также выявление определенных видов микроорганизмов, наличие которых недопустимо в испытуемой продукции.

Помещение микробиологической лаборатории на предприятиях пищевой промышленности (в том числе на мясокомбинатах, молокозаводах, хлебокомбинатах), её инженерное оснащение должно соответствовать государственным санитарно-эпидемиологическим правилам и нормативам, предъявляемым микробиологическим лабораториям, которые проводят работу с микроорганизмами III и IV групп патогенности.

Учебные микробиологические лаборатории на кафедрах вузов (факультетов) предназначены для выполнения студентами лабораторных работ согласно программам и должны быть оснащены необходимыми помещениями, где выполняются работы, и оборудованием. В состав микробиологической

лаборатории (учебной, научно-исследовательской или производственной) входят несколько помещений:

- 1 - лабораторная комната для исследований;
- 2 - комната для приготовления питательных сред;
- 3 - комната для мойки посуды (моечная);
- 4 - комната для стерилизации посуды, питательных сред (стерилизационная);
- 5 - бокс (изолированная комната для работ, требующих повышенной стерильности).

Помещения лаборатории должны быть непроходными. Стены окрашивают светлой масляной краской или облицовывают плиткой, полы покрывают линолеумом или легко моющейся плиткой. Комнаты, где выполняются основные микроскопические исследования, должны быть обращены на север или северо-запад, так как для микроскопирования необходим ровный рассеянный свет. Прямые солнечные лучи утомляют зрение, наносят вред оптическим приборам и микроорганизмам. Естественная освещенность рабочего помещения должна соответствовать световому коэффициенту 1 : 5. Лабораторная мебель должна быть простой и удобной. Лабораторные столы, покрытые специальным пластиком, линолеумом или другими легко моющимися и дезинфицирующимися материалами, ставят у окон, чтобы свет падал спереди или сбоку (лучше с левой стороны). Высота столов не должна превышать 0,7 м. Столы для проведения микологических исследований покрывают стеклами, под которые подкладывают листы белой и черной бумаги для лучшего рассмотрения культур грибов и пигмента исследуемых колоний. Столы для работы снабжают удобными винтовыми стульями. Бокс разделяют на две части: рабочее помещение и предбоксик, что исключает циркуляцию воздуха и занесение микроорганизмов извне. В боксе устанавливают лабораторный стол, стулья, бактерицидные лампы (укрепленные на выдвигающемся кронштейне или подвешенные). Перед работой помещение бокса обеззараживается.

При микробиологическом анализе пищевых продуктов применяются бактериоскопические и бактериологические исследования. Методом бактериоскопического исследования определяют морфологические особенности отдельных микроорганизмов и их тинкториальные свойства (способность окрашиваться различными красителями). Методом бактериологического исследования определяют культуральные признаки и биохимические свойства микроорганизмов.

1.2 Правила работы в микробиологической лаборатории

Работа в микробиологической лаборатории проводится в условиях стерильности, что является основным правилом техники безопасности.

В учебных заведениях не разрешается работать с живыми патогенными микроорганизмами. Но, несмотря на это, в учебной микробиологической лаборатории соблюдается такой же режим работы, как в производственных санитарно-бактериологических лабораториях, где работают с заразным материалом. На практических занятиях преподаватели и студенты должны помнить, что они имеют дело с микроорганизмами, которые не всегда могут быть безвредными для окружающей среды и здоровья человека. При посеве сапрофитных микроорганизмов из окружающей среды случайно может быть внесена и патогенная микрофлора, а между патогенностью и непатогенностью микроорганизмов нет резкой разницы. Примером может служить все увеличивающаяся роль условно-патогенных микроорганизмов в патологии человека.

Поэтому важно знать (!), что с любым исследуемым материалом необходимо работать как с потенциальным источником опасности для здоровья человека. Работа с сапрофитными бактериями в ряде случаев требует абсолютной стерильности для получения надежных результатов опыта. В микробиологической практике используют главным образом чистые культуры

микроорганизмов. *Чистой* называют культуру, содержащую микроорганизмы одного вида. Если в культуре содержится более одного вида микроорганизмов, она носит название *смешанной*.

В микробиологической лаборатории для обеспечения стерильности необходимо соблюдать *три основные правила*, исключая возможность внутрилабораторного обсеменения исследуемого материала, развития аллергии у персонала и распространения патогенных бактерий за пределы лаборатории.

Для этого работа выполняется в специальной одежде (халат, шапочка или косынка). Спецодежда защищает работающего, а также предупреждает загрязнение исследуемого материала посторонней микрофлорой. *Запрещается* входить в лабораторию без халата, выходить в нем за пределы лаборатории и надевать на него верхнюю одежду. Двери лаборатории должны быть закрыты. Не допускается лишних хождений, резких движений, посторонних разговоров. В лаборатории *категорически (!) запрещается* принимать пищу, курить, хранить посторонние вещи. *Запрещается* набирать растворы пипеткой ртом: необходимо пользоваться специальными приспособлениями - шаровидной грушей, поршневыми дозаторами или другими аппаратами, исключая попадания микробов в рот. Рабочее место в процессе исследований содержит в полном порядке. Бактериологические петли, иглы, пинцеты после каждого соприкосновения с микроорганизмами обезвреживают прокаливанием в пламене горелки. Использованные стекла, шпатели, пипетки, другие инструменты помещают в 3%-ный раствор хлорамина с последующей мойкой и стерилизацией. До и после работы необходимо тщательно вымыть и продезинфицировать поверхность стола, на котором проводится работа с микроорганизмами.

Следует строго соблюдать личную гигиену – тщательно мыть с мылом и дезинфицировать руки после окончания работы и перед едой. При случайном попадании исследуемого материала или культуры микроорганизмов на

руки, халат, стол или обувь их необходимо немедленно обработать 1%-ным раствором хлорамина. После окончания работы питательные среды с посевами помещают в термостат, музейные культуры – в сейфы холодильники, приборы и аппараты устанавливают на специально отведенные для них места. После окончания работы загрязненную микроорганизмами посуду немедленно стерилизуют кипячением или автоклавированием, чтобы уничтожить живые клетки и только после этого ее моют. Плотные питательные среды с выросшими культурами на сутки заливают дезинфицирующим раствором, затем посуду моют только в резиновых перчатках.

В помещениях микробиологической лаборатории дважды в день проводят влажную уборку. Для дезинфекции пола, стен, мебели используют дезинфицирующие растворы: 2 – 3%-ный раствор двууглекислого натрия, 3 – 5%-ный раствор фенола, 0,5 – 3%-ный раствор хлорамина, 0,5%-ный раствор четвертичных аммонийных соединений. Воздух в лаборатории наиболее просто дезинфицировать проветриванием. Продолжительная вентиляция помещения через форточку (не менее 30-60 мин) приводит к резкому снижению количества микроорганизмов в воздухе, особенно при значительной разнице в температуре между наружным воздухом и воздухом помещения. Для дезинфекции также применяют облучение ультрафиолетовыми лучами с длиной волны от 200 до 400 нм, особенно при работе с мицелиальными грибами. При этом используют переносные и стационарные бактерицидные лампы. Продолжительность обработки - от 30 минут до нескольких часов в зависимости от степени загрязненности воздуха. При включенной бактерицидной лампе находиться в помещениях запрещено. В боксах проводят влажную уборку с использованием дезинфектантов, до и после работы боксы облучают бактерицидными лампами, расположенными на высоте 2 м от пола (экспозиция 15 – 30 мин).

В специальном журнале студенты и сотрудники делают запись о проведении инструктажа и ознакомлении с режимом работы в лаборатории.

1.3 Правила работы с культурами микроорганизмов

Микроорганизмы выращивают на питательных средах. Среда разливают в пробирки, колбы, матрасы и чашки Петри. Внесение микроорганизмов в питательную среду (рис. 1) называется посевом (или инокуляцией). Перед посевом на посуде (пробирке, колбе, чашке Петри) маркером делают надпись с указанием названия посевного материала и даты посева.

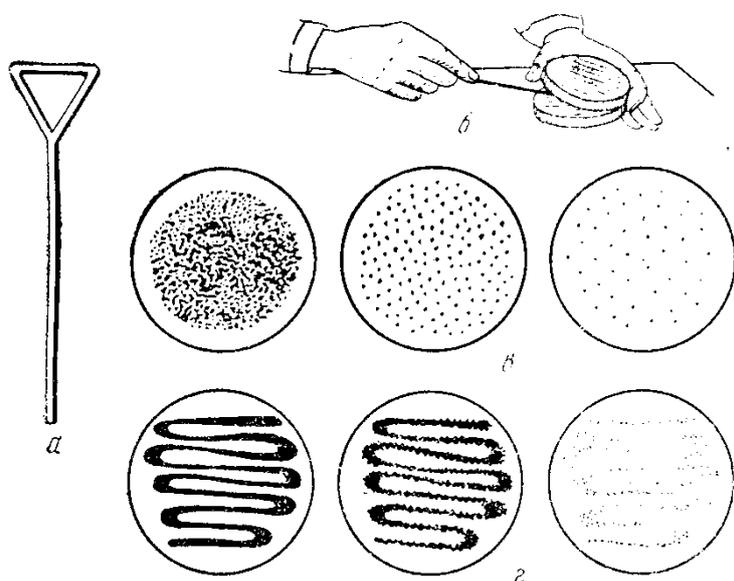


Рис. 1

а – шпатель Дригальского;
 б – положение чашки и руки при посеве шпателью;
 в – рост микроорганизмов после посева шпателью;
 г – рост микроорганизмов после посева петлей

Если микроорганизмы выращены на плотной среде, при посеве используют бактериологические петли. При пересеве культуры из жидкой питательной среды пользуются стерильной пипеткой. Использованную пипетку помещают в дезинфицирующий раствор (3 - 5%-ный водный раствор карболовой кислоты или 2%-ный раствор хлорамина), не касаясь ею окружающих предметов. Все манипуляции при посеве и пересевах следует проводить около пламени горелки (но не в пламени). Нельзя делать резкие движения и ходить около лица, работающего с чистой культурой, так как движение воздуха увеличивает вероятность случайного ее загрязнения.

1.4 Основное оборудование микробиологической лаборатории

Термостат (рис. 2 а, б). Воздушные или водяные термостаты предназначены для выращивания микроорганизмов на питательных средах при постоянной заданной температуре. В лаборатории устанавливают несколько термостатов с разной рабочей температурой, благоприятной для развития отдельных групп микроорганизмов: для мезофиллов – 28 - 30°C, термофилов – 43 - 55°C, патогенных видов - 37°C. Термостаты бывают разной формы, размеров и конструкций: от небольшого шкафчика до политермостата с несколькими отделами или отдельной термостатной комнатой.

Сушильный шкаф представляет собой аппарат со встроенным терморегулятором для сушки и стерилизации лабораторной посуды, высушивания различных материалов. Шкафы изготавливают из термостойких материалов с расчетом на диапазон температур в рабочей камере от 40 до 200° С. Длительность разогревания до предельной температуры около 1,5 часов. Внутри шкаф оборудован полками из перфорированных металлических листов, на которых размещают посуду или высушиваемый материал.

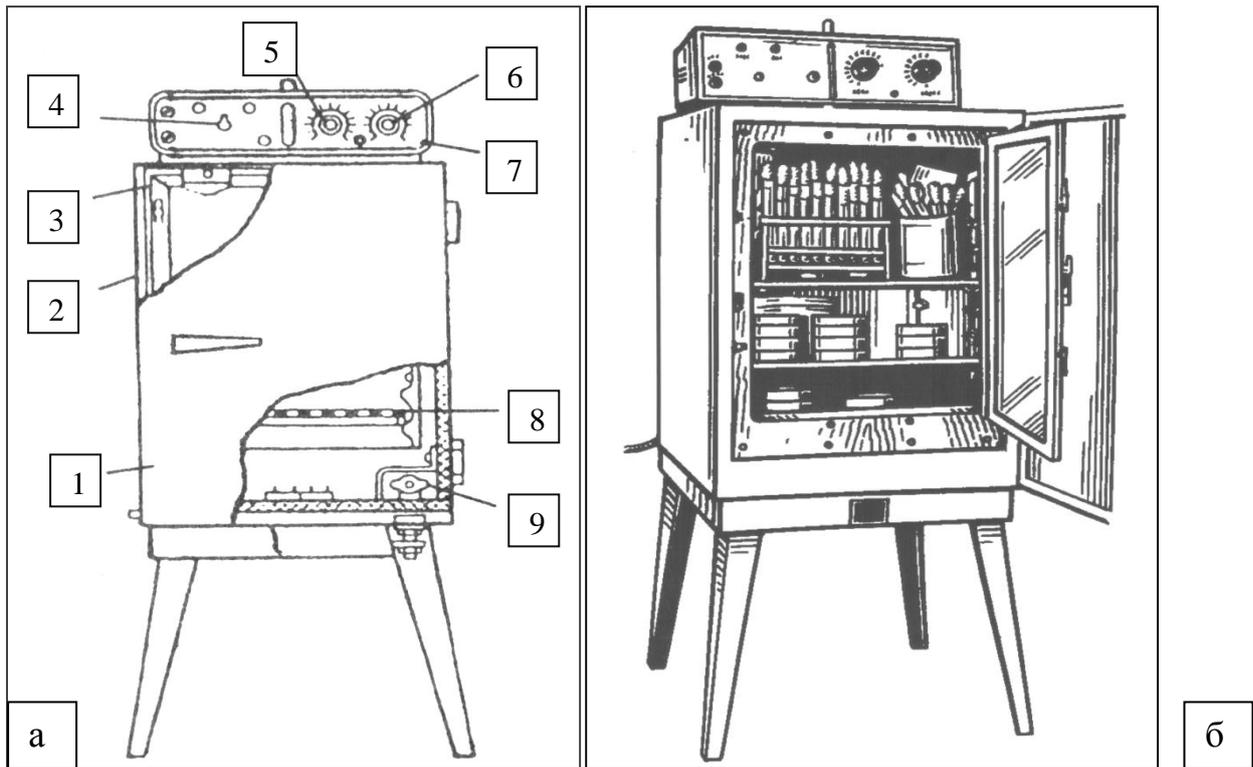


Рис. 2 - Суховоздушный термостат: а – схема устройства; б – общий вид; 1- дверь наружная; 2 – корпус; 3- дверь внутренняя; 4 – тумблер для включения термостата в сеть; 5 – потенциометр для грубой установки температуры; 6 - потенциометр для точной установки температуры; 7 – блок управления; 8 – полки; 9 – нагревательный элемент

Холодильник бытовой используют для хранения при температуре около $4 \pm 1^\circ\text{C}$ музейных и рабочих культур микроорганизмов, питательных сред, некоторых реактивов и растворов, исследуемого материала, в том числе пищевых продуктов.

Автоклав (рис. 3 а, б). Бывают вертикальные и горизонтальные автоклавы, разных размеров и конструкций, но принципиальная схема их устройства одинаковая. Автоклавы служат для стерилизации материалов насыщенным паром под давлением выше атмосферного.

Лабораторный рН-метр предназначен для измерения активности ионов водорода (рН) и окислительно-восстановительного потенциала (Eh).

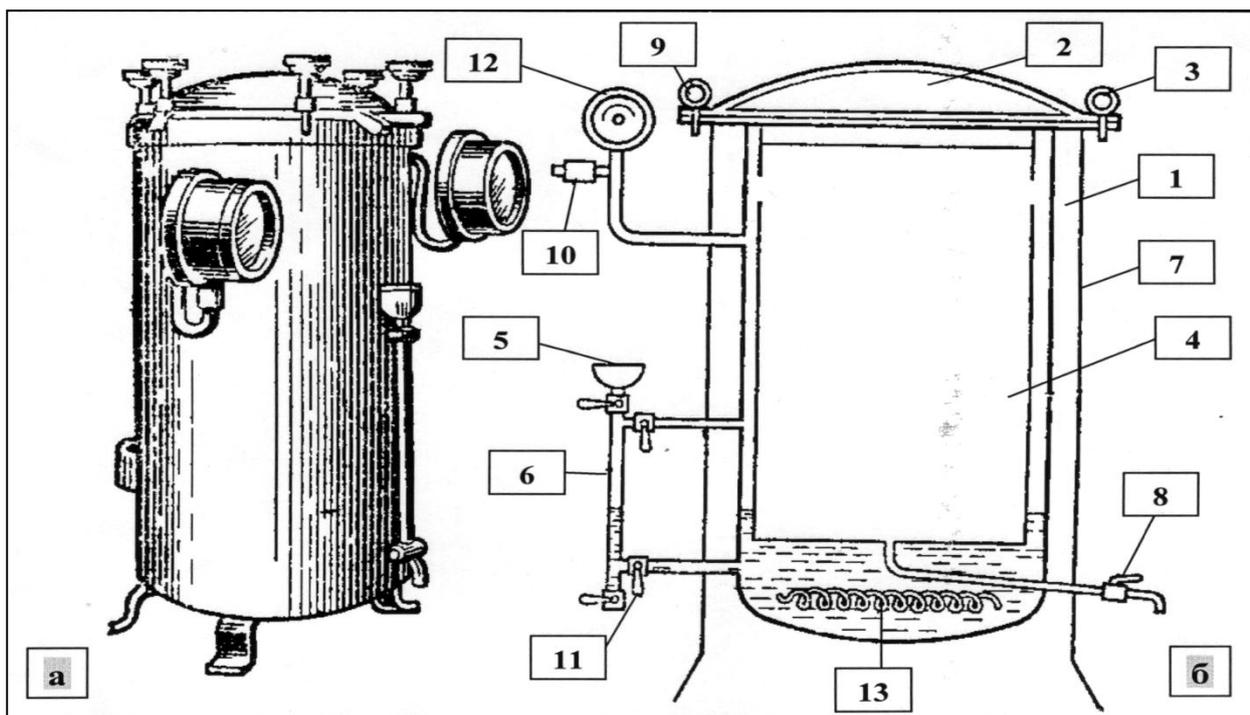


Рис. 3 – Автоклав: а - общий вид; б - схема устройства

1 – котел; 2 – крышка; 3, 9 – винтовые зажимы; 4 – камера стерилизации; 5 – воронка; 6 – водомерная трубка; 7 – кожух; 8 – паровыпускной кран; 10 – предохранительный клапан; 11 – трехходовой кран; 12 – манометр; 13 – нагревательный элемент

Центрифуга служит для разделения жидких и твердых фаз суспензий и взвесей. Снабжена двумя роторами, которые попеременно насаживаются на вал электродвигателя: ротор-крестовина с четырьмя стаканами и ротор углового типа с гнездами для стеклянных или полиэтиленовых пробирок. Скорость вращения роторов от 3000 до 6000 об/мин.

Посуда. Для микробиологических исследований используют стеклянную или пластмассовую посуду. Для выделения чистых культур, количественного учета микроорганизмов, анализа микрофлоры на плотных питательных средах и других исследований применяют чашки Петри. Для выращивания анаэробных микроорганизмов используют колбы Виноградского, плоские бутылки-матрацы, качалочные колбы, для изучения процессов брожения - пробирки и колбы с поплавками. Больше распространение получает

использование одноразовых чашек Петри и дозиметрических механических пипеток со съёмными наконечниками (микродозиметры).

Инвентарь и другие инструменты. Помимо вышеперечисленного оборудования микробиологическая лаборатория должна быть оснащена приборами для различных видов микроскопии, водяной баней, анаэроостатом, камерами Горяева, окулярным микрометром, инструментами для взятия и обработки материала (маникюрные кусачки, ложечки Фолькмана, лопаточки, «копья» из тугоплавкого металла, препаровальные иглы, пинцеты, ножницы, бактериологические петли, шпатели), штативами для пробирок, предметными стеклами обычными, с углублением и покровными; электроосветителями для микроскопов; набором красителей, дезинфицирующими средствами, ватой, марлевыми или фланелевыми салфетками, песочными часами, карандашами по стеклу, фильтровальной бумагой, металлическими колпачками, ватно-марлевыми и резиновыми пробками, металлическими цилиндрами для пипеток, проволочными или металлическими корзинами с отверстиями для стерилизации пробирок.

Бактериологические петли и иглы (рис. 4) изготавливают из платиновой, никелевой или хромоникелевой проволоки длиной 8 см, диаметром 0,2 - 0,5 мм, которую впаивают в стеклянные палочки или вставляют в металлические держатели. Свободный конец проволоки загибают в виде петли с плотно прижатым концом, иначе жидкость в кольце не будет удерживаться.

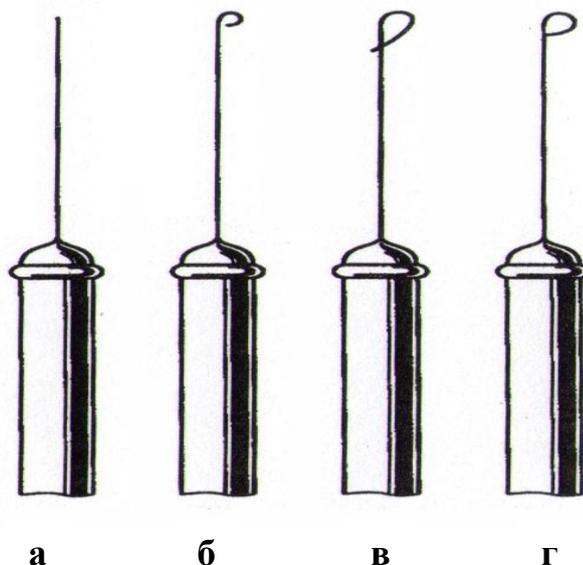


Рис. 4 – Игла и петли (бактериологические) для пересева микроорганизмов а – игла; б, в – петли изготовлены неправильно; г – петля изготовлена правильно

Изготовление ватных пробок. Колбы и пробирки, используемые для приготовления и стерилизации питательных сред и выращивания культур микроорганизмов, закрывают ватными пробками (рис. 5) или металлическими колпачками и термостойкими резиновыми пробками (рис. 6).

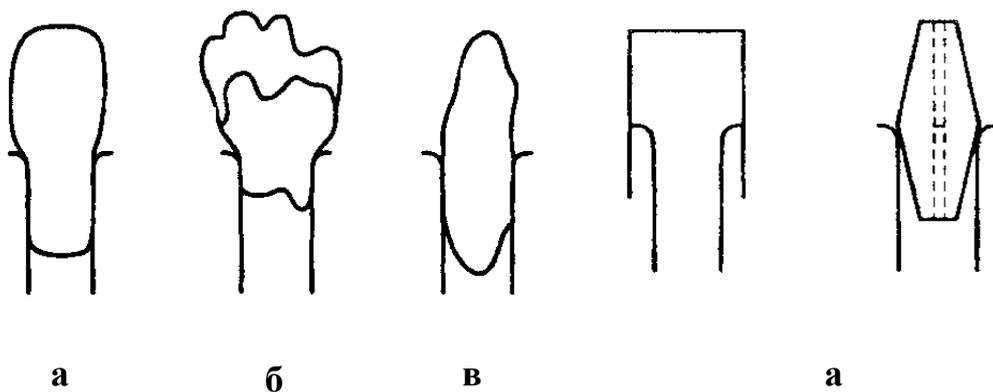


Рис. 5 – Ватные пробки
а – изготовлена правильно;
б, в – изготовлены неправильно

Рис. 6 – Металлические колпачки (а)
и резиновые пробки (б)

Ватную пробку изготавливают вручную или с помощью специальной машины. Правильно изготовленная пробка должна иметь длину 3 - 4 см, уме-

ренно туго входить в пробирку или колбу, быть плотной и не менять форму при многократном применении. Ватная пробка лучше сохраняется, если ее обернуть кусочком марли, концы которой в верхней части плотно завязать ниткой. Резиновые пробки изготовлены из специальной термостойкой резины, выдерживают автоклавирование.

Вопросы для самоконтроля

1. Каковы основные правила работы в микробиологической лаборатории?
2. Какие требования предъявляют к помещениям микробиологической лаборатории?
3. Какие помещения, входят в состав микробиологической лаборатории и каково их назначение?
4. Что такое «дезинфекция» и с какими целями ее применяют?
5. Какими методами и растворами дезинфицируют пол, стены и мебель?
6. Как дезинфицируют воздух в лаборатории?
7. Подготовка рабочего места и правила поведения в лаборатории.
8. Как обрабатывают посуду после использования в работе с микроорганизмами?
9. Какое оборудование и инвентарь применяются в лабораторной практике?
10. Каковы основные правила работы с культурами микроорганизмов?

Занятие 2. Устройство и правила работы с микроскопом. Методы микроскопического исследования

Цель занятия. Изучить устройство и правила работы с биологическим микроскопом. Ознакомить студентов с методами микроскопического исследования.

2.1 Устройство и правила работы с микроскопом

Устройство микроскопа. Изучение клеток микроорганизмов, размеры которых измеряются в микрометрах ($1 \text{ мкм} = 0,001 \text{ мм}$), стало возможным с появлением микроскопа (от греч. *micros* - малый, *skopeo* - смотрю).

Микроскоп - это оптический прибор для рассматривания в увеличенном виде и фотографирования объектов, невидимых невооруженным глазом. Основан на работе двух систем линз (*объектива и окуляра*). С его помощью изучают строение, рост и развитие микробных клеток, проводят идентификацию микроорганизмов, ведут наблюдения за характером развития микробных сообществ (ценозов) в различных субстратах. Микроскоп (рис. 7) состоит из двух частей: механической и оптической. Главной является оптическая часть.

Механическая часть представлена массивным основанием (ножка, подкова, башмак), на котором крепятся предметный столик, тубусодержатель, тубус. Фокусировка микроскопа производится макрометрическим и микрометрическим винтами. К тубусу прикреплена револьверная головка с объективами. В микроскоп с бинокулярными тубусами можно смотреть обоими глазами, при этом оба тубуса могут раздвигаться по ширине глаз.

Ножка (1) подковообразной или прямоугольной формы служит опорой микроскопа.

Тубусодержатель (7) используется в качестве ручки при переносе микроскопа (см. правила работы с микроскопом). Вверху тубусодержатель имеет гнездо для прямого или наклонного тубуса (**9**).

Тубус (9) - зрительная трубка микроскопа. В верхнее отверстие тубуса свободно вставляется окуляр (**10**). В нижней части тубуса прикреплена вращающаяся револьверная головка (**12**) с объективами (**14**). Вращая насадку, можно быстро менять объективы во время работы. Объектив должен быть центрирован, т. е. установлен в рабочее положение. При закреплении объектива в рабочем положении ощущается щелчок.

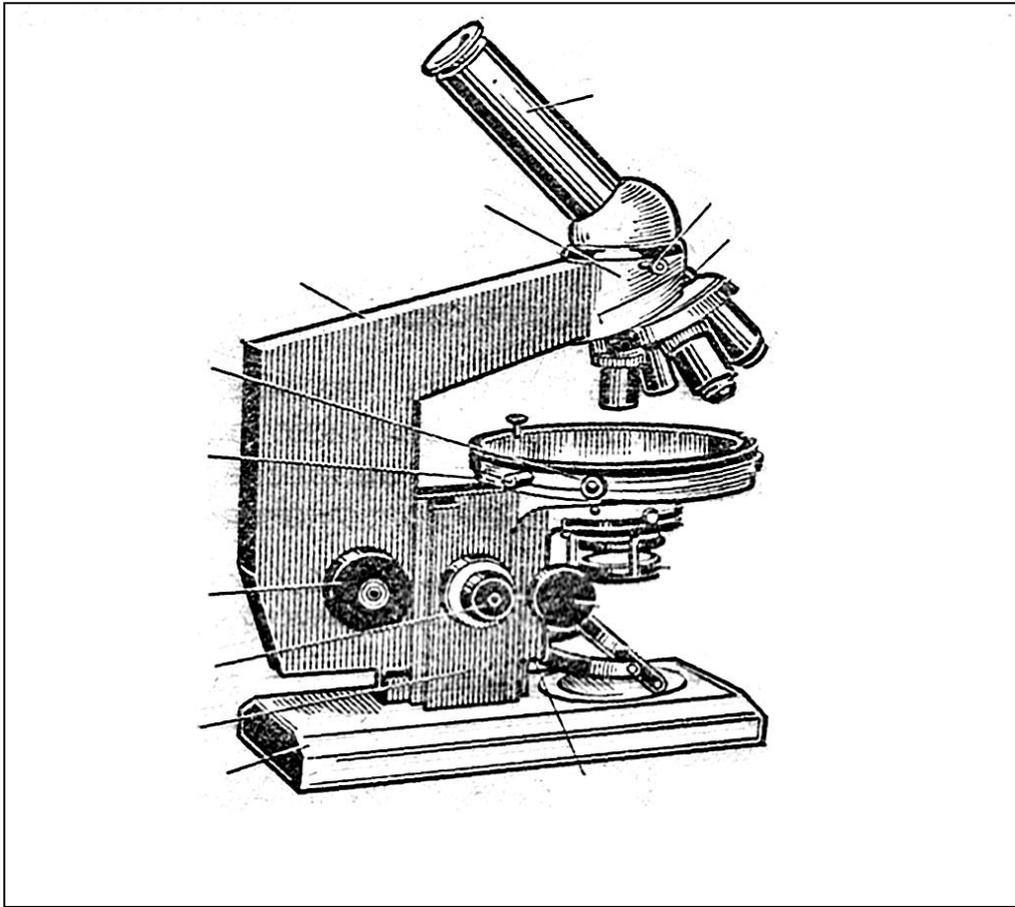


Рис. 7 – Устройство микроскопа

1 – ножка (основа); 2 – коробка с механизмом микрометрической фокусировки; 3 – микрометрический винт; 4 – макрометрический винт; 5, 6 – винты для перемещения предметного столика; 7 – тубусодержатель; 8 – головка тубусодержателя; 9 – тубус; 10 – окуляр; 11 – винт для крепления насадки; 12 – револьверная система с объективами; 13 – винт, фиксирующий револьверную систему относительно оси тубуса; 14 – объектив; 15 – предметный столик; 16 – конденсор с ирисовой диафрагмой; 17 – винт для крепления конденсора; 18 – дополнительная линза; 19 – винт перемещения конденсора; 20 – кронштейн конденсора; 21 – зеркало

Предметный столик (15) предназначен для размещения на нем изучаемого объекта (препарата), который закрепляют имеющимися на столике зажимами (клеммами). В центре предметного столика находится отверстие для прохождения лучей света, освещающих препарат. Предметный столик можно

передвигать в двух направлениях с помощью двух симметрично расположенных на краях столика **винтов (5, 6)**. Столик может быть также закреплен неподвижно.

Винты – макрометрический (4) и микрометрический (3). При вращении винтов по часовой стрелке тубус опускается, при вращении против часовой стрелки - поднимается. Макрометрический винт используется для ориентировочной установки объектива на «фокус», т.е. на то расстояние от препарата, при котором он делается видимым. Поворот макрометрического винта на один оборот поднимает или опускает тубусодержатель на 2 мм. Микрометрический винт служит для точной установки объектива. Его полный оборот поднимает или опускает тубус на 0,1 мм.

Оптическая система включает оптическую (объектив и окуляр) и осветительную части и предназначена для увеличения изображения предмета.

Осветительная часть микроскопа состоит из зеркала, конденсора и ирис-диафрагмы, расположенных под предметным столиком микроскопа.

Зеркало (21) имеет две поверхности: плоскую и вогнутую. Оно отражает световые лучи и направляет их к конденсору. При естественном освещении и больших увеличениях применяют плоское зеркало, при искусственном и естественном освещении работая с малыми увеличениями (без конденсора) - вогнутое.

Конденсор (16) представляет собой систему линз, служит для усиления яркости освещения рассматриваемого объекта. Собирая лучи света, отраженные зеркалом, конденсор концентрирует их в плоскости препарата. Конденсор можно передвигать в вертикальном направлении с помощью винта. При опускании конденсора поле зрения микроскопа затемняется, при поднятии - освещается. Работая с малыми увеличениями конденсор опускают, с большими - поднимают.

Ирис-диафрагма (16) расположена под конденсором. Состоит из тонких металлических пластинок, которые с помощью рычажка можно сдвигать или

раздвигать, при этом отверстие диафрагмы суживается или расширяется (рис. 8). Служит для регулирования степени освещения и четкости изображения.

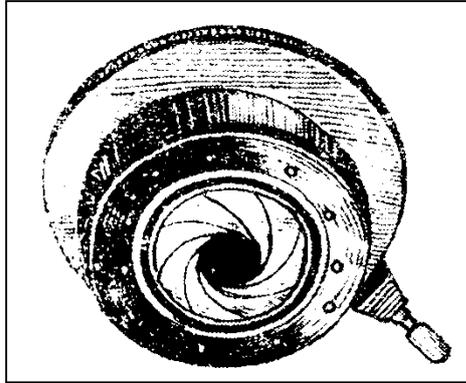


Рис. 8 – Ирис-диафрагма

Оптическая часть микроскопа представлена объективами и окулярами.

Объектив (14) состоит из линз, заключенных в металлическую оправу. Линза, обращенная к предмету, называется фронтальной. Чем больше кривизна линз, тем короче фокусное расстояние и больше увеличение объектива. Объектив дает действительное, увеличенное, обратное изображение предмета. На оправе каждого объектива нанесены цифры, показывающие его увеличение.

Биологические микроскопы МБР-1, МБИ-1, Биолам и другие обычно имеют 3 - 4 объектива с цифровыми обозначениями 8, 20, 40, 90, показывающими их собственное увеличение.

Объективы подразделяют на *сухие* и *иммерсионные* (погружные). При использовании сухого объектива (8х, 20х или 40х) между его фронтальной линзой и рассматриваемым препаратом находится воздух. При работе с иммерсионным объективом (90х) на предметное стекло помещают иммерсионное масло. Коэффициент преломления иммерсионного масла примерно равен коэффициенту преломления стекла. Световые лучи при переходе из стекла в слой масла не преломляются и, не отражаясь, попадают в объектив (рис. 9). Этим достигается наилучшее освещение рассматриваемого объекта. Приме-

нение иммерсионного масла также повышает разрешающую способность микроскопа.

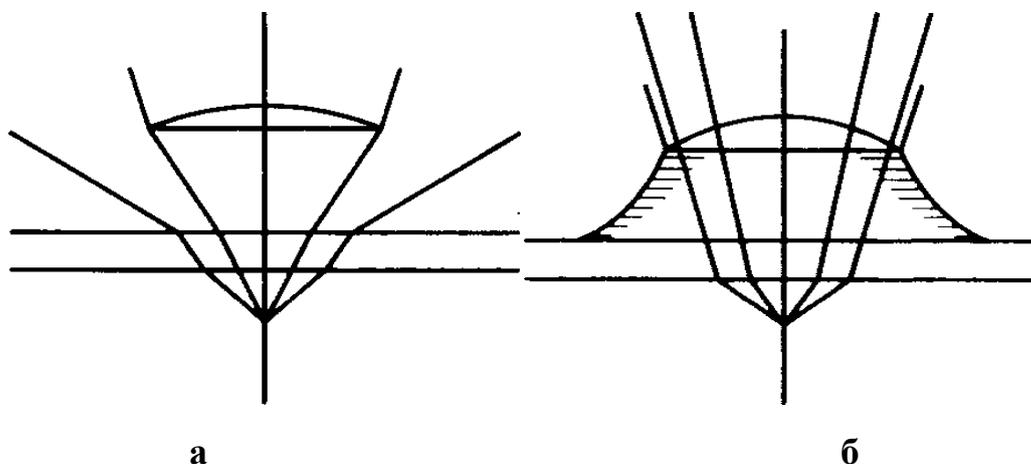


Рис. 9 – Ход лучей в сухой (а) и иммерсионной (б) системах

Окуляр (10) (от лат. *Oculus* - глаз) вставляется в верхний конец тубуса и представляет собой систему двух плоско-выпуклых линз, обращенных выпуклостью в сторону объектива. Линза, обращенная к глазу, называется глазной, а линза, обращенная к препарату - собирающей. Биологические микроскопы снабжены тремя сменными окулярами. На оправе верхней линзы каждого окуляра указано его увеличение (x7, x10, x15). Для определения общего увеличения используемой оптической системы следует умножить увеличение объектива на увеличение окуляра. Например, применяя объектив 8x и окуляр x10, получаем общее увеличение микроскопа, равное 80.

Осветитель. При микроскопировании часто применяют электрический свет, используя специальные осветители (ОИ-7, ОИ-19, ОИ-21 и др).

Правила работы с микроскопом. Приступая к работе с микроскопом, необходимо последовательно выполнять следующие правила.

1. Микроскоп вынимают из футляра и переносят к рабочему месту, удерживая его одной рукой за тубусодержатель, а другой – за основание

микроскопа. Наклонять микроскоп в сторону нельзя, так как при этом окуляр может выпасть из тубуса.

2. Микроскоп помещают на рабочем столе от края стола на расстоянии 3 - 5 см.

3. Устанавливают правильное освещение поля зрения микроскопа. Для этого, глядя в окуляр микроскопа, зеркалом направляют луч света от настольного осветителя (являющегося источником света) в объектив. Настройка освещения производится с объективом 8х. При правильной установке поле зрения микроскопа будет выглядеть в виде круга хорошо и равномерно освещенного.

4. На предметный столик помещают исследуемый препарат и закрепляют его клеммами.

5. Сначала препарат рассматривают с объективом 8х, а затем переходят к большим увеличениям. Для получения изображения объекта необходимо знать фокусное расстояние (расстояние между объективом и препаратом). При работе с объективом 8х расстояние между препаратом и фронтальной линзой составляет около 9 мм, с объективом 40х - 0,6 мм, с объективом 90х - около 0,15 мм.

6. Тубус микроскопа необходимо, осторожно опуская, приблизить к препарату на расстояние, несколько меньшее рабочего. Затем, глядя в окуляр, тем же винтом, медленно вращая его на себя, поднимать тубус до тех пор, пока в поле зрения не появится изображение изучаемого объекта.

7. После этого вращением микрометрического винта фокусируют объектив так, чтобы изображение объектива стало четким. Микрометрический винт нужно вращать осторожно, не более чем на половину оборота в ту или другую сторону.

При смене объектива, дающего малое увеличение, на объектив большего увеличения выполняют следующие правила:

1. Прежде чем сменить объектив, рассматриваемый объект (или его участок) ставят в центре поля зрения микроскопа при малом увеличении.

2. Слегка приподнимают тубус и затем переводят объектив с помощью револьвера. Это необходимо, так как объектив большего увеличения всегда бывает длиннее.

3. Для того, чтобы в поисках фокусного расстояния не раздавить препарат и не повредить линзу объектива, тубус с подведенным под него объективом опускают до самой поверхности препарата, а затем, смотря в окуляр, очень медленно (чтобы не пропустить появления очертаний предмета) поднимают.

4. При смене объективов следует регулировать интенсивность освещения объекта. Желаемую степень освещенности получают, опуская или поднимая конденсор. Так, при просмотре препарата с объективом 8х конденсор опускают, при переходе на объектив 40х - несколько приподнимают, а при работе с объективом 90х - поднимают вверх до предела.

Правила работы с иммерсионным объективом. При работе с иммерсионным объективом на препарат предварительно наносят каплю иммерсионного (кедрового) масла и, глядя сбоку, опускают осторожно тубус микроскопа макрометрическим винтом так, чтобы линза объектива погрузилась в каплю масла. Затем, глядя в окуляр, тем же винтом очень медленно поднимают тубус до тех пор, пока не увидят изображение. Точную фокусировку производят микрометрическим винтом.

Препарат рассматривают в нескольких местах, передвигая предметный столик боковыми винтами или препарат вручную. При изучении препарата следует все время пользоваться микрометрическим винтом, с тем, чтобы рассмотреть препарат во всей его глубине. Рассматривают препарат в микроскоп левым глазом. Правый глаз при этом должен оставаться открытым. Или пользоваться ими попеременно. Левую руку держат на микрометрическом винте и слегка вращают его (влево и вправо). Этим достигается возможность

рассмотрения поверхностных и более глубоких участков объекта. Правой (свободной) рукой делают зарисовку того, что видно в поле зрения.

После окончания работы следует снять препарат с предметного столика, опустить конденсор, поставить под тубус объектив 8х, мягкой тканью удалить иммерсионное масло с фронтальной линзы объектива 90х и убрать микроскоп в футляр.

2.2 Методы микроскопического исследования

В микробиологической практике микроскопия, как первый этап микробиологического исследования, имеет лишь вспомогательное, ориентировочное значение. Разрешающая способность метода составляет в среднем 100 000 клеток в 1 мл.

В микробиологических лабораториях применяются не только обычные методы оптической микроскопии в проходящем свете, но и специальные: в темном поле зрения, фазово-контрастный, люминесцентный и электронный.

Световая микроскопия. Световой микроскоп имеет сухой и иммерсионный объективы. Сухой объектив с относительно большим фокусным расстоянием и слабым увеличением обычно применяют для изучения относительно крупных биологических и гистологических объектов. При изучении микроорганизмов используют главным образом иммерсионный («погружной») объектив с небольшим фокусным расстоянием и более высокой разрешающей способностью (увеличение 60х -100х). При иммерсионной микроскопии объектив погружают и масло (кедровое, персиковое, «иммерсиол» и др.), показатель преломления которого близок к показателю преломления стекла. В этом случае лучи света, пройдя через предметное стекло, не меняют своего направления и не рассеиваются, а попадают в объектив (рис. 9). Разрешающая способность иммерсионного объектива около 0,2 мкм. Макси-

мальное увеличение современных оптических микроскопов достигает 2000 - 3000.

Микроскопия в темном поле зрения. Этот вариант микроскопии проводится с использованием специального приспособления темного поля (микроскоп с таким устройством еще называют ультрамикроскопом). При боковом освещении в темном поле зрения наблюдают живые объекты величиной 0,02 - 0,06 мкм. Клетки микроорганизмов ярко светятся на темном фоне. Источником искусственного света служит электрический осветитель.

Фазово-контрастная микроскопия помогает выявить новые детали структуры живых микроорганизмов, изучить различные стадии их развития, влияние на них химических веществ, антибиотиков и других факторов.

Люминесцентная микроскопия. Люминесценция (или флюоресценция) - это способность некоторых объектов и красителей при попадании на них ультрафиолетовых или других коротковолновых лучей света испускать лучи видимой части спектра (зеленые, желтые, оранжевые). Различают *собственную* (первичную) и *наведенную* (вторичную) флюоресценцию. При первичной флюоресценции исследуемый объект содержит вещества (витамины, пигменты и другие продукты обмена), способные флюоресцировать при освещении их ультрафиолетовыми лучами. Большая часть объектов микроскопии не обладает собственной флюоресценцией, поэтому при люминесцентной микроскопии их обрабатывают красителями (*флюорохромами*), способными флюоресцировать. В качестве флюорохромов используют *аурамин* (для микобактерий туберкулеза), *акридиновый желтый* (для гонококков), *корифосфин* (для коринебактерий дифтерии), *флюоресцеинизотиоцианат*, или **ФИТЦ** (для изготовления меченых антисывороток) и др.

Люминесцентные микроскопы представляют собой обычные биологические микроскопы, снабженные ярким источником света (как правило, ртутно-кварцевые лампы, излучающие ультрафиолет и сине-фиолетовые лучи, возбуждающие люминесценцию) и набором светофильтров, предназна-

ченных для выделения из общего светового потока строго определенных участков спектра. Флюорохромы, связываясь с нуклеиновыми кислотами (НК) или белками, образуют стойкие комплексы, которые светятся в люминесцентном микроскопе желто-зеленым, оранжево-красным, коричнево-красным цветами.

Преимущества люминесцентной микроскопии: цветное изображение, значительная контрастность, возможность исследования и живых и погибших микроорганизмов, прозрачных и непрозрачных объектов, обнаружение отдельных бактерий, вирусов и их антигенов (АГ), установление их локализации; дифференцирование отдельных компонентов клетки.

Электронная микроскопия. В электронном микроскопе вместо света используется поток электронов в безвоздушной среде, на пути которых находится анод. Источником электронов является электронная пушка (вольфрамовая проволока, разогреваемая до 2500 - 2900° С). Роль оптических линз играют электромагниты. Между вольфрамовой нитью и анодом создается электрическое поле с напряжением 30 000 - 50 000 В, что сообщает электронам большую скорость и они, проходя через отверстие анода, попадают в конденсор. Электронные лучи при выходе из конденсора собираются в плоскости исследуемого объекта, отклоняются под разными углами за счет различной толщины и плотности препарата и попадают в электромагнитную линзу объектива, снабженного диафрагмой. Электроны, мало отклонившиеся при встрече с объектом, проходят через диафрагму, а отклонившиеся под большим углом задерживаются, благодаря чему обеспечивается контрастность изображения. Линза объектива дает промежуточное увеличенное изображение, которое рассматривают через смотровое окно. Проекционная линза позволяет увеличивать изображение во много раз. Это изображение попадает на флюоресцирующий экран и может фотографироваться. Новейшие электронные микроскопы дают возможность видеть частицы величиной 0,2 - 2,0 нм (в зависимости от типа объекта).

Электронную микроскопию широко используют в микробиологии для детального изучения строения микроорганизмов, в вирусологии - с диагностической целью.

Для исследования препаратов в электронном микроскопе вместо предметных стекол применяются специальные пленки, незначительно поглощающие электроны. Они крепятся на опорные сетки. Материалом для приготовления пленок служат коллодий, окись алюминия и кварц. Тщательно очищенный от различных примесей и нанесенный на пленку исследуемый материал после испарения жидкости оставляет на ней тончайший слой, который и подлежит микроскопии. В электронном микроскопе можно также исследовать срезы тканей, клеток, микроорганизмов, полученные с помощью ультрамикротомов. Препараты контрастируют с помощью электронноплотных (задерживающих электроны) веществ, используя разные методы: напыление тяжелых металлов, обработка фосфорно-вольфрамовой кислотой, уранилацетатом, солями осмиевой кислоты и др.

Лабораторная работа 2.1 (№1) - Устройство биологического микроскопа. Правила работы с биологическим микроскопом.

Цель работы. Освоить устройство биологического микроскопа, правила работы с ним. Ознакомиться с правилами смены объективов с малого увеличения на большее, научиться пользоваться иммерсионным объективом.

Материалы и оборудование. Микроскоп, готовые препараты для микроскопии, иммерсионное масло для микроскопии, салфетки, спирт для снятия иммерсионного масла с объектива микроскопа и препаратов.

Задание студентам

В соответствии с описанием в теоретической части необходимо:

1. Вспомнить устройство светового микроскопа и правила работы с ним.
2. Рассмотреть исследуемый объект под малым увеличением.

3. Рассмотреть под иммерсионным объективом готовые фиксированные и окрашенные бактериальные препараты в последовательности, указанной преподавателем.
4. Зарисовать изученные под разным увеличением препараты с указанием увеличения.
5. Отключить микроскоп от сети, освободить объектив и изучаемый препарат от иммерсионного масла (осторожно протереть тампоном, смоченным 96%-ным спиртом-ректификатом).
6. Привести микроскоп в «состояние покоя», поставить на место, накрыть футляром.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие виды микроскопии Вам известны?
2. Правила работы с микроскопом.
3. Правила смены объектива микроскопа.
4. Для каких целей предназначен биологический микроскоп?
5. Из каких частей состоит микроскоп?
6. Назовите основные элементы механической части микроскопа?
7. Назовите основные элементы оптической части микроскопа?
8. Укажите отличие объектива сухого и иммерсионного.
9. Правила работы с иммерсионным объективом
10. При помощи каких элементов микроскопа регулируют степень освещенности препарата?

Занятие 3. Методы стерилизации питательных сред и посуды

Цель занятия. Изучить назначение, методы, способы и режимы стерилизации, применяемые в микробиологических лабораториях. Ознакомить студентов с оборудованием, используемым для стерилизации, с преимуществами и недостатками различных методов и способов стерилизации

Стерилизация является важнейшим и необходимым приемом в микробиологической практике. Слово «стерилизация» в переводе с латинского означает обеспложивание (лат. *sterilis* - бесплодный). Стерилизация - это тотальное (полное) уничтожение микроорганизмов в различных субстратах. Стерилизация обеспечивает гибель в стерилизуемом материале вегетативных и споровых патогенных и непатогенных микроорганизмов. Известны *физические, химические и биологические* методы стерилизации.

Физические методы стерилизации подразделяют на термические [прокаливание в пламени или обжигание (*фламбирование*), стерилизация сухожаровая (*горячим воздухом*), насыщенным паром под давлением (*автоклавирование*), *дробная (тиндализация), кипячение*] и холодные (*фильтрование, различные виды излучений*).

Применение того или иного способа обусловлено особенностями материала, подлежащего стерилизации, в первую очередь его физическими и химическими свойствами, а иногда и целью исследования.

Физические методы стерилизации:

- **стерилизация путем прокаливания на огне (фламбирование)** - способ стерилизации, при котором происходит полное обеспложивание стерилизуемого объекта, так как погибают вегетативные клетки и споры микроорганизмов. Обычно в пламени горелки или спиртовки прокаливают предметы, которые не портятся под действием огня. Мелкие металлические инструменты (бактериологические петли, иглы, пинцеты, ножницы, шпатели) стерилизуют прокаливанием в пламени (нагреванием докрасна) непосредственно перед использованием. Кратковременно обжигают над пламенем предметные и покровные стекла, стеклянные шпатели и палочки, фарфоровые ступки и пестики, горлышки колб, пробирок, бутылок, а также ватные пробки при посевах культур и разливе сред.

- **стерилизация кипячением** применяется для стерилизации металлических и стеклянных инструментов. С этой целью используют специальные стерилизаторы. Инструменты помещают в холодную дистиллированную во-

ду в разобранном виде и завернутыми в марлю. Продолжительность кипячения 10-30 мин.

- **стерилизация сухим жаром** (*горячим воздухом*) осуществляется в специальных суховоздушных (сухожаровых) стерилизаторах и сушильных шкафах - в печах Пастера, представляющих собой термостат с электрическим обогревом, в котором автоматически на заданном уровне может поддерживаться необходимая высокая температура. Сухим жаром стерилизуют стеклянную лабораторную посуду (чашки Петри, пробирки, колбы, пипетки и др.), предварительно тщательно вымытую, высушенную и плотно завернутую в бумагу и закрытую ватно-марлевыми пробками (для сохранения стерильности после прогревания). Посуду загружают в стерилизатор (или в сушильный шкаф) не слишком плотно, чтобы обеспечить циркуляцию воздуха и равномерный надежный прогрев. По окончании стерилизации шкаф не открывают до тех пор, пока температура в нем не упадет до 80°C, так как при резком охлаждении иногда нарушается стерильность материала, а сильно нагретое стекло может растрескаться. Продолжительность стерилизации зависит от температуры. Чем выше температура, тем короче время стерилизации. Температура, при которой проводится стерилизация, должна быть не ниже 140°C и не выше 180° С в течение 1 - 3 ч (табл. 1). При этом погибают вегетативные и споровые формы микроорганизмов. Поднимать выше температуру не рекомендуется, так как ватные пробки и бумага начинают обугливаться. О достаточной стерилизации можно судить по пожелтению ватных пробок и легкому побурению бумаги.

Таблица 1

Режимы стерилизации стеклянной посуды сухим жаром

Температура, °С	Время, мин
140	180
150	150
160	120
170	60

Питательные среды, физиологические растворы и другие жидкости, а также предметы из резины и синтетических материалов стерилизовать сухим жаром нельзя. Жидкости вскипают и выливаются, а резина и синтетические материалы разрушаются, поэтому их стерилизуют перегретым водяным паром.

- **стерилизация паром** проводится двумя способами: **паром под давлением и текущим паром**. Чаще применяется первый способ.

Стерилизацию паром под давлением производят в автоклаве (рис. 3). Автоклав представляет собой двустенный массивный котел, снаружи обшитый металлическим кожухом, герметически закрывающийся крышкой, которая плотно прижимается к горловине котла откидывающимися болтами с барашками. За счет кипения воды и герметизации в автоклаве создается повышенное давление, позволяющее поднимать температуру выше 100°C . Способ основан на воздействии на стерилизуемые материалы насыщенного водяного пара при давлении выше атмосферного. В результате такой обработки погибают вегетативные и споровые формы микроорганизмов. Установлено, что споры большинства микроорганизмов не выдерживают 5-минутную экспозицию в насыщенном паре при 121°C . Совместное действие высокой температуры и давления пара обеспечивает особую эффективность данного способа. Водяной пар при нормальном атмосферном давлении имеет температуру 100°C и обладает сильным стерилизующим свойством. $0,1\text{ МПа} = 1\text{ кгс/см}^3$. Каждому значению избыточного давления чистого водяного пара, которое фиксируется манометром, установленным на автоклаве, соответствует определенная температура кипения воды (табл. 2).

В автоклавах можно обрабатывать лабораторные приборы и мелкое оборудование, имеющее резиновые детали, халаты, питательные среды и др. Стерилизуют их в течение 20 мин при температуре 120°C . После обработки в автоклаве они хранятся длительное время, не подвергаясь обсеменению микроорганизмами и используются по мере необходимости.

Таблица 2

Температурные режимы пара в автоклаве

Показатели манометра, МПа	Температура насыщенного пара, °С	Показатели манометра, МПа	Температура насыщенного пара, °С
0	100	0,15	128
0,05	112	0,2	133,9
0,1	121	0,3	144,0

Различные питательные среды и другие материалы разливают в пробирки, колбы и закрывают ватными пробками. Предметы размещают не слишком плотно, так как пар должен проходить между ними, иначе они не нагреваются до нужной температуры и могут остаться нестерильными. По окончании времени стерилизации автоклав открывают, когда давление в нем сравняется с атмосферным. Преждевременное открывание крана автоклава недопустимо, так как перегретые среды при резком снижении давления сразу же бурно закипают, смачивают и даже иногда выталкивают ватные пробки, что нарушает впоследствии стерильность материала.

Температура и длительность автоклавирования питательных сред определяются их составом, *термоустойчивостью* или *термолабильностью* компонентов. Например, простые среды (МПА и МПБ) стерилизуют 20 мин при 120°С. При этой температуре нельзя стерилизовать среды, содержащие углеводы и другие легко разрушающиеся от нагревания вещества. Такие среды стерилизуют при 112°С в течение 10 - 15 мин. Легко разрушающиеся субстраты (молоко или желатиновые среды) и субстраты, содержащие сахара, витамины (пивное сусло, соки, дрожжевой автолизат и др.) стерилизуют при 0,5 атм в течение 15-30 мин. С трудом поддаются стерилизации в автоклаве различные порошки (например, тальк) и вязкие жидкости (глицерин, вазелиновое масло), поэтому их лучше стерилизовать в сушильных шкафах при

160°С в течение 2-х или 1 ч при 170°С. В этом случае слой масла или порошка в сосуде не должен превышать 1,5 см.

После автоклавирования питательные среды для проверки стерильности выдерживают 2 - 3 сут в термостате при 30° С. Если в средах обнаруживается рост микроорганизмов, их готовят заново. Обезвреживание инфицированного материала в автоклавах проводят в течение 1 ч при 120° С.

Важно знать! К работе с автоклавом допускаются только специально подготовленные лица, которые должны строго и точно выполнять правила, указанные в инструкции, прилагаемой к аппарату.

- ***стерилизация текучим паром (дробная стерилизация)*** применяется в лабораторной практике для получения эффекта стерильности при температуре, не превышающей 100° С. Дробную стерилизацию питательных сред проводят в автоклаве с закрытой, но не завинченной крышкой, иногда пользуются аппаратом Коха. Это металлический цилиндрический сосуд, покрытый снаружи теплоизоляционным материалом, на дно которого наливается вода, над водой на решетке помещают стерилизуемые предметы. При кипячении воды все предметы оказываются в атмосфере пара (при температуре 100° С), вытекающего через неплотно закрывающуюся крышку, отчего и возникло выражение «***стерилизация текучим паром***». Текучим паром стерилизуют среды, состав которых изменяется под действием температуры выше 100° С (среды с сахарами, многоатомными спиртами, желатином). Сущность дробной стерилизации состоит в том, что нагревание среды (или ее компонентов) проводят при температуре 100° С трое суток подряд по 30 мин.

В первый день стерилизуют 30 мин, при этом погибают вегетативные формы микробов, споры сохраняются. Ко второму дню большинство спор прорастает. На второй день при 30-минутной стерилизации образовавшиеся в результате прорастания спор вегетативные клетки погибают. Прорастают ранее не проросшие оставшиеся споры. На третий день после 30 мин стерили-

лизации погибают вегетативные формы, образовавшиеся в результате прорастания оставшихся спор. То есть при такой обработке достигается стерилизация не только аспорогенного, но и спорового материала.

Кратковременное прогревание среды кипячением уничтожает в основном термолабильные вегетативные клетки микроорганизмов. Поэтому питательные среды между нагреваниями выдерживают при комнатной температуре (или в термостате при температуре 30°C) и дают возможность прорасти оставшимся жизнеспособным спорам. Образовавшиеся из термоустойчивых спор вегетативные клетки погибают при повторном кипячении. Продолжительность нагревания зависит от объема жидкости и может быть увеличена до 40 - 60 мин.

- стерилизация облучением. Для стерилизации помещений, оборудования, некоторых медицинских принадлежностей, пищевых продуктов используют различные виды излучений: инфракрасное, ультрафиолетовое, рентгеновские лучи, α -, β - и γ -лучи радиоактивных элементов. Чаще других в микробиологической практике используют ультрафиолетовое облучение. Мощность ультрафиолета измеряется в бактах. Доза УФ-излучения, губительная для различных видов микроорганизмов (кроме спор), составляет 5 мкб/см².

- стерилизация фильтрованием. Стерилизацию жидких субстратов и сред, не выдерживающих даже незначительного нагревания, проводят с помощью фильтрования через специальные мелкопористые бактериальные фильтры, легко адсорбирующие клетки микроорганизмов: асбест, целлюлозу, фарфор, каолин и др. Фильтрованию подвергают среды с аминокислотами (цистеин и цистин), углеводами, белками, антибиотиками, витаминами, летучими веществами, а также культуральные жидкости в целях освобождения от клеток и сохранения всех продуктов метаболизма в неизменном виде. На бактериальных фильтрах задерживаются механические взвешенные примеси, в том числе и клетки микроорганизмов.

Стерилизующими фильтрами теоретически считают такие, размер пор которых не превышает 0,20 мкм. Наиболее широкое распространение в микробиологической практике получили мембранные фильтры, которые в зависимости от величины пор применяют для фильтрования и стерилизации. Для стерилизации используют отечественные фильтры фирм «Владипор», «Владисарт» с диаметром пор 0,20 мкм. Фильтры изготовливают из положительно заряженных материалов. Поэтому на стенках фильтров возникает соответствующий положительный заряд. Вследствие того, что большинство микроорганизмов в водных растворах несет на поверхности отрицательный заряд, при фильтровании имеет место не только механическая задержка клеток, но и их адсорбция. К пористым фильтрам относят свечи Шамберлана, Беркефельда. Плотные диски, изготовленные из смеси асбеста с целлюлозой, называются фильтрами Зейтца. Фильтрацию проводят под давлением или созданием разреженного пространства (вакуума) ниже фильтра (рис. 10). При этом бактерии остаются на поверхности фильтра, вирусы и фильтрующиеся формы бактерий проходят через фильтры. Разделение микроорганизмов проводят в тех случаях, когда невозможно применить другие методы.

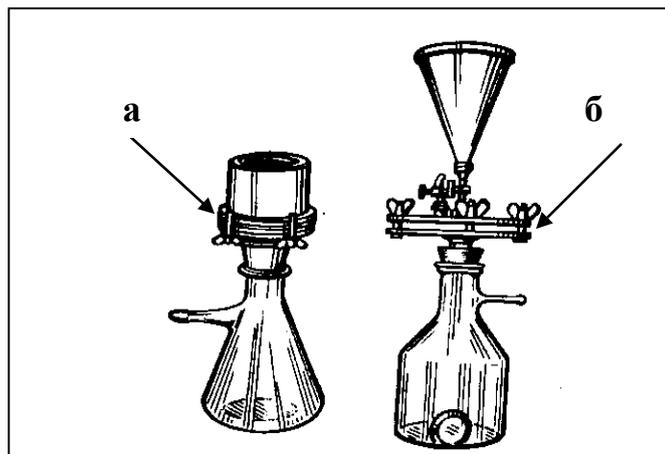


Рис. 10 – а, б Фильтры Зейтца

- **пастеризация.** Метод предложен Луи Пастером для обеззараживания сред, которые изменяют свои свойства под действием высоких температур. Пастеризацию проводят при температуре до 100° С (обычно 70 - 90° С). При температуре 70° С материал нагревают в течение 30 мин, при 90° С - 15 мин.

Важно знать (!), что при пастеризации погибают только вегетативные формы микробов, а споры сохраняются. Пастеризацию можно использовать для отделения споровых культур или спор от вегетативных форм микробов. После нагревания материала остаются споры, при высеве которых можно получить спорообразующую культуру микробов. Пастеризацию применяют в различных отраслях пищевой промышленности (пастеризация соков, вин, молока и др.), в хозяйствах для обеззараживания молока от больных бруцеллезом и туберкулезом животных. Продукт при этом равномерно нагревают во всей толще, что достигается его перемешиванием. В наши дни на предприятиях молочной промышленности используется ультрапастеризация.

Химические методы стерилизации:

- **использование различных антисептиков для консервирования питательных сред.**

- **стерилизация газообразными веществами.** Аппаратуру, имеющую зеркальное, оптическое и радиоэлектронное оборудование, а также изделия из термолабильных пластмасс, например центрифужные пробирки, стерилизуют газовым методом. Для газовой стерилизации применяются только те соединения, которые обладают спороцидными свойствами. Это оксид этилена, метилбромид, оксид пропилена, формальдегид, глутаральдегид, бета-пропиолактон, озон и др. Газовую стерилизацию проводят в специальных герметически закрывающихся аппаратах. Стерилизуемые объекты, помещаемые в камеру, упаковывают как при стерилизации в автоклаве или сушильном шкафу. При проведении газовой стерилизации строго соблюдают правила работы с ядовитыми газообразными веществами.

Лабораторная работа 3.1 (№ 2) - Оборудование микробиологической лаборатории. Подготовка посуды к стерилизации

Цель работы. Ознакомление с правилами работы в микробиологической лаборатории, с особенностями подготовки помещения, оборудования и лабораторной посуды к работе с микроорганизмами.

Материалы и оборудование. Термостат, центрифуги, автоклав, сушильный шкаф, фильтры, бактерицидные лампы, пипетки, чашки Петри, шпатели, пробирки, колбы, предметные стекла, пергаментная бумага, вата, марля.

Задание студентам.

1. Ознакомиться с устройством и использованием основных приборов и оборудования микробиологической лаборатории.

2. В соответствии с описанием этого процесса в теоретической части необходимо подготовить к стерилизации:

- стеклянную посуду: пипетки, пробирки, колбы, чашки Петри;
- ватно-марлевые и резиновые пробки, металлические инструменты (ножницы, пинцеты, шприцы и иглы);

3. Сделать записи в тетради.

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое стерилизация?
2. Цели стерилизации в микробиологической практике?
3. Какие виды стерилизации существуют?
4. Перечислите методы и способы стерилизации.
5. Перечислите способы термической стерилизации.
6. Перечислите способы холодной стерилизации.
7. Что такое фламбирование?
8. Режимы проведения сухожаровой стерилизации?
9. Для каких целей проводится стерилизация паром? Назовите существующие способы.
10. Для каких целей и как проводится автоклавирование (принцип метода)?

11. Цели стерилизации текучим паром?
12. Какой способ стерилизации называют дробным?
13. Что такое пастеризация? Цель пастеризации.
15. Что такое тиндализация? Цель тиндализации.
16. Какой способ стерилизации проводится путем прерывания нагревания?
17. Цели стерилизации фильтрованием?
18. Для каких целей проводится стерилизация газообразными веществами?
19. Стерилизация облучением. Перечислите виды облучений.

Занятие 4. Методы приготовления и способы окрашивания препаратов для микроскопирования

Цель занятия. Изучить методы изготовления и окрашивания бактериальных препаратов для микроскопии.

4.1 Изготовление препаратов и их окрашивание для световой микроскопии

Выбор методов микроскопического анализа и способов окрашивания определяется конкретной целью исследования.

- Подготовка рабочего места

Приготовление мазков, их окраску и другие микробиологические манипуляции осуществляют на заранее подготовленном рабочем месте. На столе должны находиться только материалы и предметы, необходимые для данного исследования, а именно: изучаемый объект, пробирки или чашки Петри с культурой микроорганизмов, стерильная водопроводная вода или изотонический раствор хлорида натрия (ИХН – 0,9%-ный раствор NaCl), штатив для бактериологической петли, банки с чистыми обезжиренными предметными стеклами, карандаши по стеклу, газовая горелка или спиртовка, растворы красителей, ванночка с подставкой (*мостик*) для стекол, сосуд с водой для

промывания препаратов, пинцеты, фильтровальная бумага, емкость с дезинфицирующим раствором для отработанных препаратов и пипеток.

- Подготовка предметных и покровных стекол

Для изготовления бактериальных препаратов используют предметные стекла толщиной не более 1,2 - 1,4 мм и покровные стекла размером 18x18 и 22x22 мм. Новые стекла помещают для обезжиривания в 96%-ый этиловый спирт или в смесь из равных частей абсолютного спирта и эфира (жидкость Никифорова). Использованные предметные стекла помещают в дезинфицирующий раствор, моют (в перчатках) мыльным раствором, стараясь не поцарапать, затем тщательно промывают водой, высушивают в сушильном шкафу и хранят в 96%-м этиловом спирте или в жидкости Никифорова. Для изготовления мазков предметные стекла заранее извлекают пинцетом из жидкости, в которой они хранились и насухо вытирают. Перед использованием поверхности стекол обжигают в пламени горелки. Капля, нанесенная на правильно подготовленное предметное стекло, равномерно растекается и не принимает шаровидную форму.

- Приготовление красителей для окрашивания бактериальных препаратов

Окраска микроорганизмов представляет собой сложный физико-химический процесс соединения химических компонентов клетки с краской. При взаимодействии красителя с веществами микробной клетки образуются соли, обеспечивающие прочность окраски. Отношение разных видов микроорганизмов к красителям называют *тинкториальными свойствами*.

Красящие растворы готовят из анилиновых красителей. Красители бывают основные (щелочные), нейтральные и кислые. Для окрашивания бактерий в основном используют основные красители. Это связано с тем, что красящая часть молекулы основного красителя заряжена положительно, поэтому она более активно вступает в соединение с отрицательно заряженной бакте-

риальной клеткой. Кислые красители бактерий не окрашивают, их применяют для окрашивания фона препарата.

Все применяемые красители имеют порошкообразный или кристаллический вид. Из красителей фуксин основной, генциановый фиолетовый, метиленовый синий заранее готовят насыщенные спиртовые растворы (см ниже по тексту). Из насыщенных спиртовых и феноловых растворов красителей готовят водно-феноловые или водно-спиртовые растворы, используемые для окраски простыми и сложными методами. Для приготовления фенолового фуксина Циля, отличающегося стойкостью при хранении, используют основной фуксин. Бактерии и другие микроорганизмы окрашиваются фуксином Циля в красный цвет.

Феноловый фуксин Циля

Основной фуксин	1 г
Спирт этиловый (95%-й)	10 мл
Фенол кристаллический	5 г
Глицерин	3 - 4 капли
Вода дистиллированная	100 мл

Фуксин с кристаллами фенола и несколькими каплями глицерина растирают в ступке до гомогенной массы, понемногу добавляя спирт, затем, не прекращая перемешивания, постепенно доливают дистиллированную воду. Краситель выдерживают 48 ч при комнатной температуре и фильтруют. Срок хранения длительный.

Фуксин Пфейффера

Фуксин Циля	1 мл
Вода дистиллированная	9 мл

При окраске фуксином Пфейффера следует использовать свежеприготовленный раствор.

Насыщенный спиртовой раствор метиленового синего

Метиленовый синий	10 г
--------------------------	-------------

Спирт этиловый (95%-й) 100 мл

Щелочной раствор метиленового синего по Леффлеру

Насыщенный спиртовой раствор метиленового синего 30 мл

Натрия (калия) гидроксид (1%-й) 1 мл

Дистиллированная вода 100 мл

Водно-спиртовой раствор метиленового синего

Насыщенный спиртовой раствор метиленового синего 10 мл

Дистиллированная вода 100 мл

Старые растворы этого красителя обладают лучшей красящей способностью.

Спиртовой раствор генцианвиолета

Генциан фиолетовый 2 г

Спирт этиловый (95%-й) 20 мл

Вода дистиллированная 80 мл

Генциан фиолетовый, метиловый фиолетовый и кристаллический фиолетовый принадлежат к красителям трифенилметанового ряда, что позволяет применять их в одинаковой степени для окраски по методу Грама. Краситель растворяют, растирая в ступке с добавлением спирта, затем добавляют воду, настаивают в течение 1 суток при комнатной температуре и фильтруют готовый раствор.

Йодный раствор Люголя

Йод кристаллический (I₂) 1 г

Калия йодид 2,5 г

Вода дистиллированная 300 мл

Смешать ингредиенты и оставить на сутки для растворения йода (иногда приходится добавлять кристаллы KI).

Обесцвечивающий раствор

Ацетон 400 мл

Спирт этиловый (95%-й) 1200 мл

Внимание! Отдельные компоненты и смесь огнеопасны. Возможно использование компонентов по отдельности или в других соотношениях. Обесцвечивание ацетоном происходит более быстро.

Раствор сафранина

Сафранин (2,5%-й раствор в 95%-м этиловом спирте) 25 мл

Вода дистиллированная 75 мл

Вначале готовят 2,5%-й спиртовой раствор сафранина, затем смешивают его в указанной пропорции с водой. В нашей стране в качестве второго красителя чаще используют фуксин Пфейффера (см выше), который лучше прокрашивает, например, клетки грамотрицательных анаэробов.

Приготовление препаратов живых клеток

Микроорганизмы в живом состоянии рассматривают в препаратах «раздавленная капля», «висячая капля» и «отпечаток», используя сухие системы объективов. Изучают процессы размножения, спорообразования, влияния на микроорганизмы химических и физических факторов. В практических лабораториях изучение микроорганизмов в живом состоянии используют для определения их подвижности.

Характер движения бактерий зависит от вида микроорганизмов, числа жгутиков, возраста и особенностей культуры, температуры, наличия различных химических веществ и других факторов. Хорошо выражена подвижность у молодых особей, у старых она замедлена или совсем отсутствует. Подвижность прекращается с накоплением продуктов жизнедеятельности. Наличие или отсутствие движения - один из признаков при определении вида микроорганизмов. Жгутики осуществляют вращательные движения и по-разному располагаются на теле микробной клетки.

В зависимости от расположения жгутиков микробные клетки делят на **монотрихи** (монопольные монотрихи) - клетки с одним жгутиком на одном из концов, **лофотрихи** (монопольные политрихи) - пучок жгутиков располагается на одном из концов, **амфитрихи** (бипольные политрихи) - жгутики

располагаются на каждом из полюсов, *перитрихи* - жгутики расположены по всей поверхности клетки, *атрихи* - бактерии, лишённые жгутиков (рис. 11). Наибольшей подвижностью обладают монотрихи и лофотрихи.

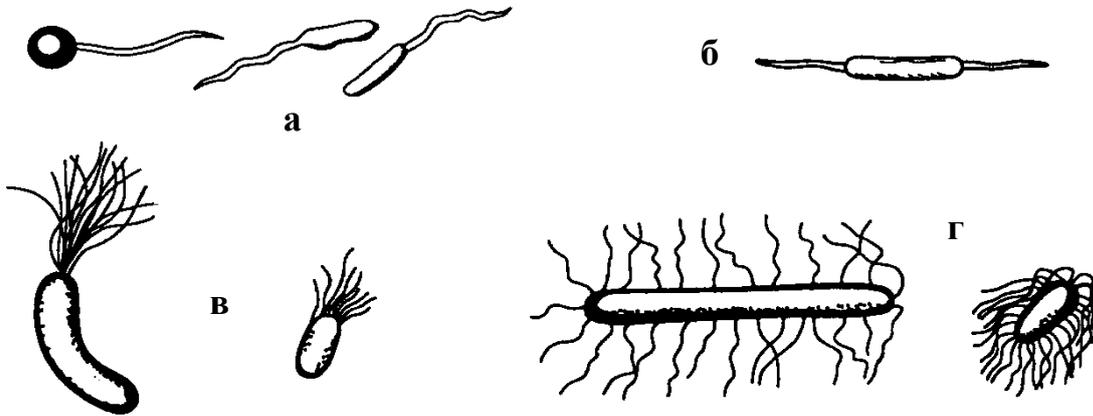


Рис. 11 – Жгутики бактерий: а – монотрих; б – амфитрих; в – лофотрих; г - перитрих

- *приготовление препарата «раздавленная капля»*. На середину предметного стекла наносят небольшую каплю воды или физиологического раствора (0,9 % -ный раствор NaCl). В эту каплю бактериологической петлей или иглой вносят культуру, отобранную с плотной питательной среды или другой исследуемый материал (дрожжи, тесто), хорошо перемешивают до получения слабо мутной суспензии. Если препарат надо приготовить из культуры, выросшей на жидкой питательной среде, каплю воды на предметное стекло не наносят. Покровное стекло ставят на ребро у края капли с микроорганизмами и постепенно опускают на каплю так, чтобы исключить появление между стеклами пузырьков воздуха, которые будут мешать микроскопированию. Другим концом бактериологической петли осторожно прижимают покровное стекло к предметному. Излишек жидкости, выступающей за края покровного стекла, убирают фильтровальной бумагой. При изучении препарата можно установить форму и размеры клеток, их физиологическое состояние, характер размножения, расположение спор, наличие в клетке пи-

тательных веществ. Недостатком препарата является его высыхание. Для предохранения от высыхания края покровного стекла смазывают вазелином.

- *приготовление препарата «висячая капля»*. Берут специальное предметное стекло с лункой (с углублением), края которой смазывают вазелином. Покровное стекло проводят через пламя спиртовки, в центр стекла помещают небольшую каплю (D 2-3 мм) исследуемого материала. Предметное стекло переворачивают лункой вниз и накрывают им каплю так, чтобы она оказалась в центре лунки (рис. 12). Слегка прижимают стекло, чтобы вазелин приклеил покровное стекло. Капля оказалась в герметически закрытой камере. Это позволяет изучать препарат в течение нескольких дней. В капле хорошо видна подвижность бактерий. Недостаток препарата «висячая капля» - оптические дефекты изображения, связанные с толщиной предметного стекла и наличием лунки.

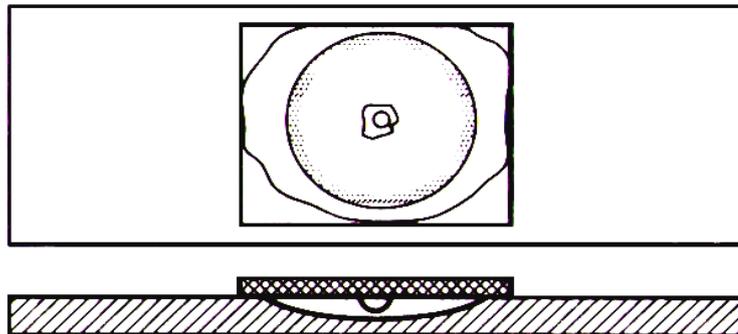


Рис. 12. Приготовление препарата «висячая капля»

Препараты «раздавленная капля» и «висячая капля» микроскопируют в затемненном поле зрения. Вначале используют малое увеличение (объектив 8х), после обнаружения края капли устанавливают объектив 40х. Изученные препараты для обеззараживания помещают в дезинфицирующий раствор.

- *приготовление препарата «отпечаток»*. Препарат «отпечаток» делают из пищевых продуктов плотной консистенции (мясо, ветчина, сыр и др.), на которых мицелиальные грибы растут сплошным газоном в виде ко-

лоний. Скальпелем вырезают небольшой кубик или отдельную колонию и переносят на предметное стекло. Микроорганизмы должны быть на поверхности кубика. Прикладывают чистое покровное стекло, слегка надавливают на него петлей или иглой и сразу снимают, стараясь не сдвинуть в сторону. Покровное стекло с отпечатком помещают в каплю воды или раствор метиленовой сини (1 : 40) на предметном стекле и микроскопируют.

Окрашивание живых клеток микроорганизмов. В практической работе в некоторых случаях применяют прижизненную окраску живых микроорганизмов (для выявления функциональных особенностей клеток и дифференциации их включений). В качестве красителей используют нейтральный красный, нейтральный фиолетовый, метиленовый синий, фуксин, эозин и др. в небольших концентрациях.

Для окрашивания живых клеток микроорганизмов на предметном стекле каплю исследуемого материала смешивают с каплей раствора красителя, накрывают покровным стеклом и через 2-3 мин микроскопируют.

- *негативное окрашивание.* Для представления о естественной форме, величине, строении микроорганизмов, их отдельных структурах готовят негативные препараты. Для негативного окрашивания применяют жидкую тушь, 3%-ный водный раствор конго красного, др. красители, которые не проникают в живые микробные клетки. Для этого, например, каплю туши и раствора красителя смешивают с каплей культуры, покрывают покровным стеклом и рассматривают с использованием сухих объективов. Красители заполняют пространство вокруг клеток, в результате неокрашенные микроорганизмы отчетливо выделяются в виде ярко освещенных бесцветных капсул на темном поле препарата.

Лабораторная работа 4.1 (№ 3) – Приготовление препаратов «раздавленная капля» и «висячая капля» для микроскопирования

Цель занятия. Освоить метод приготовления препаратов «раздавленная капля» и «висячая капля». Провести микроскопическое исследование подвижных форм живых микроорганизмов, определить характер их движения.

Материалы и оборудование. Пробирки с суточной культурой почвенных микробов в штативе (почвенная болтушка), бактериологические петли, изотонический раствор натрия хлорида, предметные и покровные стекла, предметные стекла с углублением (лункой), вазелин, стеклянные палочки для нанесения вазелина, спиртовка, спички, микроскоп, дезинфицирующий раствор. Плакат «Жгутики бактерий».

Задание студентам

1. Приготовить препараты «раздавленная капля» и «висячая капля», используя суточную бульонную культуру почвенных микроорганизмов.
2. Провести негативное окрашивание живых клеток в препарате «раздавленная капля» с использованием туши.
3. Рассмотреть приготовленные препараты почвенных микроорганизмов в живом состоянии в последовательности, указанной преподавателем.
4. Охарактеризовать микроорганизмы в живом состоянии и определить характер их движения в препарате «висячая капля».
5. Зарисовать изученные препараты.

Лабораторная работа 4.2 (№ 4) – Методы изготовления фиксированных окрашенных препаратов клеток микроорганизмов

Цель работы. Освоить методы и технику изготовления фиксированных препаратов клеток микроорганизмов для их последующего окрашивания и микроскопирования.

Материалы и оборудование. Культуры микроорганизмов, выращенных на твердых и жидких питательных средах, бактериологические петли, стериль-

ная вода, изотонический раствор натрия хлорида, предметные и покровные стекла, спички, спиртовка, дезинфицирующий раствор.

Фиксированными считают клетки микроорганизмов, в которых прерваны жизненные процессы, но полностью сохранена тонкая структура. Окрашивание фиксированных клеток позволяет выделить микроорганизмы и их детали на фоне препарата. Это облегчает изучение формы, размеров, элементов клеток, упрощает их подсчет. Фиксированные препараты обычно рассматривают с иммерсией. Приготовление фиксированных окрашенных препаратов проходит в четыре этапа: приготовление мазка, высушивание, фиксация и окраска мазка.

- *приготовление мазка.* Мазки готовят на чистых обезжиренных предметных стеклах. Предметное стекло берут пинцетом или пальцами за ребра и проносят через пламя горелки, слегка обжигая. Затем кладут обожженной стороной кверху на мостик (две параллельные стеклянные палочки, соединенные кусочками резинового шланга) над ванночкой.

Для приготовления мазка из культуры, выращенной на плотной среде (рис. 13), на охлажденное предметное стекло помещают маленькую каплю стерильной водопроводной воды или изотонического раствора хлорида натрия (ИХН). Большим и указательным пальцами левой руки берут пробирку с культурой. Правой рукой берут бактериологическую петлю и обжигают (фламбируют) в пламени горелки. Ватную пробку извлекают из пробирки мизинцем правой руки. Край пробирки осторожно фламбируют в пламени горелки и через пламя в пробирку вводят бактериологическую петлю. Петлю следует остудить о внутреннюю стенку пробирки, прикасаясь ею к питательной среде на границе стекла (если петля недостаточно охлаждена, то она вызывает треск и расплавление среды). Охлажденной бактериологической петлей прикасаются к культуре на поверхности среды. Петлю извлекают из пробирки, края пробирки осторожно обжигают, закрывают проведенной через пламя пробкой и ставят в штатив.

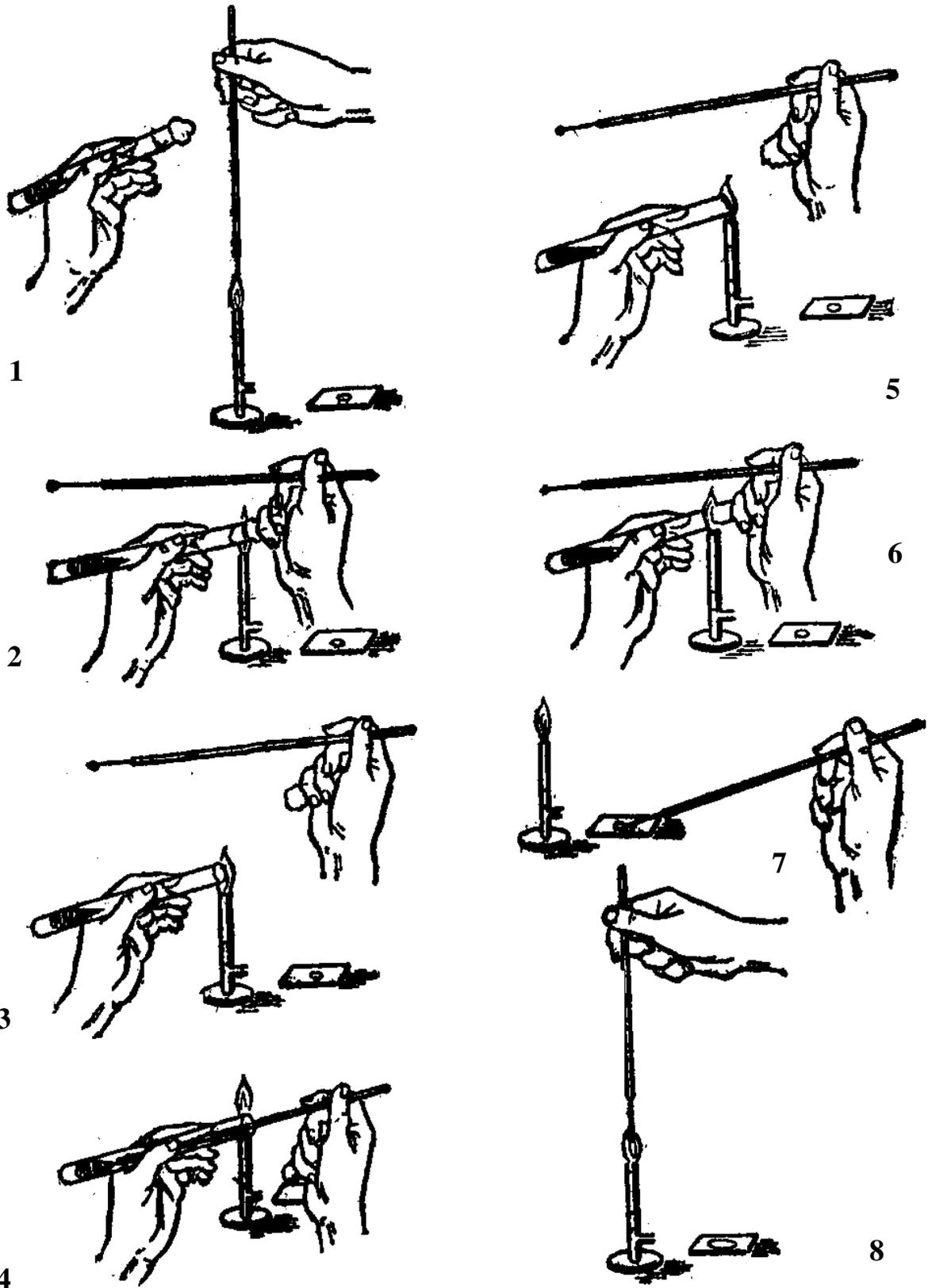


Рис. 13 – Последовательность операций приготовления препарата-мазка из культуры бактерий, выращенной на плотной среде

Культуру бактерий вносят в каплю воды или в ИХН на предметном стекле и готовят мазок диаметром 1,0 - 1,5 см, равномерно распределяя культуру петлей тонким слоем по стеклу. Бактериологическую петлю обжигают в пламени горелки и ставят на место. Со стороны мазка на стекле указывают номер анализа или культуры.

Для приготовления мазка из культуры, выращенной в жидкой питательной среде на середину обезжиренного в пламени горелки предметного стекла наносят каплю культуры петлей или пастеровской пипеткой, равномерно распределяют каплю по стеклу. Затем пипетку погружают в дезинфицирующий раствор, бактериологическую петлю фламбируют.

С обратной стороны предметного стекла восковым карандашом очерчивают границы препарата, так как очень тонкие мазки препарата на стекле не заметны. Со стороны мазка на стекле указывают номер анализа или культуры. Мазок должен быть настолько тонким, чтобы высыхал сразу после его приготовления.

- *высушивание мазка*. Лучше всего сушить готовый препарат при комнатной температуре на воздухе. Хорошо приготовленный тонкий мазок высыхает быстро. Если высушивание мазка замедлено, то препарат можно слегка нагреть в струе теплого воздуха, держа мазком вверх высоко над пламенем горелки.

- *фиксация мазка* преследует несколько целей:

а) убить микроорганизмы, то есть сделать мазок безопасным для исследователя;

б) обеспечить лучшее прилипание клеток к стеклу;

в) сделать мазок более восприимчивым к окраске, так как мертвые клетки окрашиваются лучше, чем живые.

Самым простым и распространенным способом фиксации является термическая обработка. Для этого препарат трижды проводят через наиболее горячую часть пламени горелки, держа предметное стекло мазком вверх.

Предметное стекло нагревают 2 - 3 с, пока не возникнет ощущение лёгкого жжения, если приложить его к кисти руки. Важно знать (!), что мазок не следует перегревать. Перегрев мазка приводит к грубым изменениям клеточных структур, иногда - внешнего вида клеток, например, к их сморщиванию. Недостаточно хорошо зафиксированный мазок смывается со стекла при последующей обработке.

Другим способом является фиксация мазка химическими веществами. Применяется для изучения тонкого строения микробной клетки. Для этого предметное стекло с мазком погружают в стаканчик с 96%-ным этанолом на 15 - 20 мин; с безводным метанолом на 3 – 5 мин; с жидкостью Никифорова на 15 - 20 мин; со смесью 96%-ного этанола и 40%-ного раствора формалина (95:5) на 2 мин. Фиксатор можно наливать непосредственно на мазок и выдерживать указанное время. По окончании фиксации мазок осторожно промывают легкой струей дистиллированной воды и окрашивают.

- *окрашивание фиксированных препаратов*. Различают простые, сложные и дифференциальные способы окраски микроорганизмов.

При простой окраске используют один краситель. Прокрашивается вся клетка. Метод позволяет определить наличие бактерий, их форму, размеры, взаиморасположение клеток. Используют фуксин, генциановый фиолетовый, метиленовый синий.

Сложное окрашивание предусматривает применение двух или нескольких красителей, что даёт возможность дифференцировать одни микробы от других (окраска по Граму).

Дифференциальное окрашивание предполагает окрашивание не всей клетки, а её определенных структур. Метод основан на индивидуальном отношении биологических структур клетки к различным красителям (окраска спор, оболочки, ядра, капсул, запасных веществ, метакроматина и др.).

Техника простого окрашивания. Отмытый от фиксатора мазок помещают на мостик, установленный над ванночкой и пипеткой наливают на него

раствор красителя. Длительность окрашивания различна: для водного фуксина 1 - 2 мин, для метиленовой сини 3 - 5 мин.

Для получения более чистых препаратов краситель наливают на мазок, покрытый фильтровальной бумагой, или применяют полоски фильтровальной бумаги, заранее пропитанные соответствующими красителями (модификация А.В. Синева). В правильно окрашенном и хорошо промытом препарате поле зрения светлое и чистое, окрашены только клетки микроорганизмов. Фиксированные окрашенные препараты могут храниться длительное время. На морфологию и цитологию микроорганизмов существенно влияют возраст культуры, состав среды, условия культивирования.

Техника окраски по Синеву. Метод окрашивания в модификации Синева позволяет использовать вместо растворов красителей фильтровальную бумагу, заранее пропитанную красителем. На фиксированный мазок наносят несколько капель дистиллированной воды, сверху кладут окрашенную нужным красителем фильтровальную бумагу, разрезанную по размерам мазка, прижимают к поверхности стекла и выдерживают положенное время. По окончании окрашивания бумагу удаляют, препарат берут за конец стекла, держат в наклонном положении и смывают краску, направляя тонкую струю воды на ребро предметного стекла. Промывают до тех пор, пока стекающая вода станет почти неокрашенной. Препарат высушивают на воздухе или с помощью фильтровальной бумаги, которую осторожно прикладывают к стеклу. Микроскопируют под иммерсией.

Окрашивание бактерий по Граму. Метод предложен датским ученым Грамом в 1884 г. При окраске этим методом бактерии подразделяют на грамположительные (Гр+) и грамотрицательные (Гр-), что облегчает проведение дифференциальной диагностики микроорганизмов.

Техника окрашивания по Граму. На фиксированный мазок наливают карболовый раствор генцианвиолета и окрашивают 1-2 мин. Краситель сливают и, не промывая водой, мазок обрабатывают раствором Люголя до пол-

ного почернения (1 - 2 мин). По окончании обработки раствор Люголя сливают и на мазок наливают 96%-ный этиловый спирт на 30-60 сек. Покачивая слегка стекло, спирт меняют несколько раз. Иногда для исключения излишнего обесцвечивания клеток к спирту добавляют йод (2 мл 10%-ного спиртового раствора йода на 100 мл этанола). Препарат промывают водой и проводят дополнительное окрашивание водным фуксином Пфейффера (1-2 мин). Краситель сливают, препарат промывают водопроводной водой, просушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют под иммерсией.

Результат. При правильном окрашивании грамположительные бактерии имеют сине-фиолетовый цвет, грамотрицательные - красный цвет. Для контроля правильности выполнения всех операций на одном предметном стекле следует делать три мазка бактерий: один – заведомо Гр+; второй – заведомо Гр-; третий – исследуемый препарат-мазок.

Сущность метода окрашивания по Граму заключается в том, что у Гр+ бактерий при окрашивании мазка генцианвиолет прочно соединяется с йодом и белками цитоплазмы бактерий и не обесцвечивается при обработке препарата спиртом. Клетки сохраняют сине-фиолетовый цвет. Образование этого прочного соединения обусловлено наличием в цитоплазме Гр+ бактерий значительного количества магниевой соли РНК, которая и образует нерастворимый в спирте комплекс генцианвиолета с йодом. У Гр- бактерий такого сложного соединения не образуется и клетки при обработке спиртом обесцвечиваются.

- Приготовление фиксированного препарата-мазка из зубного налёта

На предметное стекло бактериологической петлей наносят каплю физиологического раствора или водопроводной воды. Небольшое количество зубного налёта осторожно снимают зубочисткой и вносят в каплю физраствора или воды, смешивают и тонким слоем распределяют по поверхности стекла. Мазок подсушивают на воздухе, фиксируют и окрашивают.

Лабораторная работа 4.3 (№ 5) - Окрашивание и микроскопирование препаратов фиксированных клеток микроорганизмов

Цель работы. Освоить методику приготовления, окрашивания и микроскопирования фиксированного препарата клеток микроорганизмов на примере препарата-мазка из зубного налета.

Материалы и оборудование. Микроскоп, предметные стекла, пинцет, бактериологическая петля, спиртовка, спички, карандаш по стеклу, столик для окраски мазков, пипетки объемом 1 и 2 см³, дистиллированная вода, пергамент, смешанная культура микроорганизмов (зубной налет), зубочистки, красители (метиленовый синий, основной фуксин, карболовый фуксин, малахитовый зеленый), иммерсионное масло.

Задание студентам

В соответствии с описанием приготовления фиксированных окрашенных клеток микроорганизмов в теоретической части необходимо выполнить следующие задания:

1. Приготовить фиксированные препараты из зубного налёта.
2. Выполнить окрашивание препаратов простым и сложным (по Граму) способами.
3. Изучить препараты с иммерсией, проанализировать, описать в сравнительном аспекте и зарисовать в тетради. Дать пояснения.
4. Записать в тетради последовательность приготовления препаратов.

Вопросы для самоконтроля

1. Какую популяцию микроорганизмов называют чистой?
2. Какую популяцию микроорганизмов называют смешанной?
3. Методы приготовления препаратов живых клеток микроорганизмов.
4. Как приготовить фиксированные окрашенные препараты клеток микроорганизмов?
5. Какова цель фиксации мазков?
6. Какие вы знаете красители для окрашивания бактерий?
7. Отличие простых методов окрашивания от сложных методов?

Занятие 5. Изучение морфологии микроорганизмов посредством световой микроскопии

Цель занятия. Изучить морфологические свойства микроорганизмов посредством световой микроскопии. Ознакомить студентов с морфологическими особенностями клеточных структур. Освоить методики изучения морфологических свойств микробных клеток.

Морфология (от греч. *morphus* – форма, *logos*- учение) – это наука, изучающая внешний вид, форму, размеры, строение, подвижность, способность к размножению и спорообразованию, тинкториальные свойства микроорганизмов.

Морфологические свойства микроорганизмов изучают с использованием микроскопа в окрашенных (фиксированных) и неокрашенных (влажных, нефиксированных) препаратах.

Морфология бактерий

Бактерии (от лат. *bacterion* - палка, палочка) – это большая группа микроорганизмов, включает около 1600 видов. Бактерии являются в основном одноклеточными организмами растительного происхождения, относятся к прокариотам (не имеют оформленного ядра), размножаются путем роста и деления клеток (обычно пополам, иногда на неравные части). Размеры бактерий измеряют в микрометрах (мкм). 1 микрометр равен 1/1000 мм.

Форма бактерий. По форме клеток практически все бактерии напоминают шар или цилиндр. Основные формы бактерий подразделяют на 3 группы: *шаровидные* (кокки); *палочковидные* (бактерии и бациллы); *извитые* (вибрионы, спириллы и спирохеты).

Встречаются и иные формы: треугольные, звездообразные, в виде замкнутого кольца, червеобразные, нитчатые, ветвящиеся.

Кокки (от греч. *coccus* – зерно, шарик) – бактерии не всегда имеют правильную круглую форму. Различают микрококки, диплококки, стрептококки, тетракокки, сарцины, стафилококки (рис. 14).

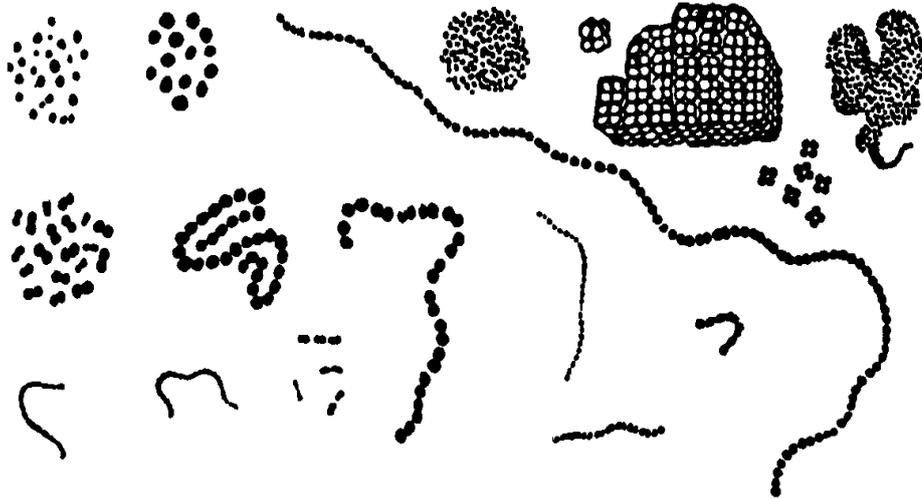


Рис. 14 – Сферические формы бактерий

- *микрококки* (от лат. *mikro* – маленький, *coccus* – зерно, шарик) располагаются одиночно, парами или беспорядочно; сапрофиты, обитают в воде, воздухе почве;

- *диплококки* (от лат. *diplos* - двойной) – бактерии, соединенные по две клетки; сапрофиты и патогенные;

- *стрептококки* (от лат. *streptos* – цепь) – кокки, расположенные в виде цепочек; сапрофиты и патогенные;

- *тетракокки* (от греч. *tetra* – четыре) – кокки, расположенные по четыре; болезни человека и животных вызывают крайне редко;

- *сарцины* (от лат. *sarcina* - связка, тюк; *sarcino* - соединяю) – кокки, образующие пакеты правильной формы из 8 - 18 клеток; сапрофиты, встречаются в воздухе, почве, кишечнике человека и животных;

- *стафилококки* (от *staphye* – виноградная кисть) – кокки, располагаются несимметричными гроздьями (в препаратах имеют форму грозди винограда); сапрофиты и патогенные.

Формообразование зависит от деления клеток в различных плоскостях.

Палочковидные – самая многочисленная группа бактерий (рис. 15).

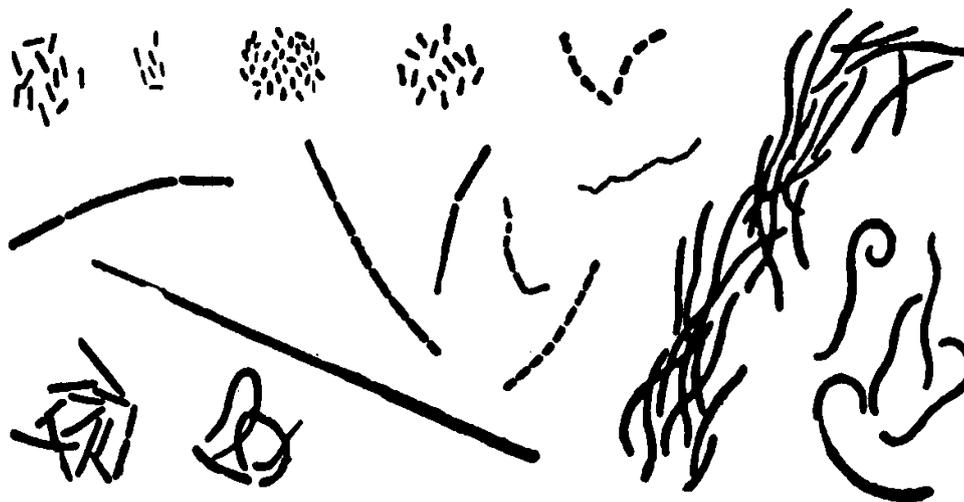


Рис. 15 – Цилиндрические формы бактерий

Длина клеток варьирует от 1 до 8 мкм, толщина - от 0,5 до 2 мкм. Сапрофиты и патогенные. Делятся на 2 группы:

- палочки, не образующие споры (бактерии);
- палочки, образующие споры (бациллы).

Палочковидные бактерии могут быть правильной (*кишечная палочка*) и неправильной формы (*актиномицеты*). Наиболее мелкие палочковидные бактерии называются *риккетсии*.

Актиномицеты - ветвящиеся грамположительные бактерии. Свое название (от греч. *actis* - луч, *mykes* - гриб) они получили в связи с возникновением в пораженных тканях друз-гранул из плотно переплетенных нитей в виде лучей, отходящих от центра и заканчивающихся колбовидными утолщениями. Актиномицеты, как и грибы, образуют мицелий - нитевидные переплетающиеся клетки (гифы). Они формируют субстратный мицелий, появляющийся в результате врастания мицелия в питательную среду и мицелий воздушный, растущий на поверхности среды. К актиномицетам относятся бифидобактерии.

Риккетсии – это мелкие грамотрицательные палочковидные бактерии размером 0,35 - 1 мкм; облигатные внутриклеточные паразиты. Форма и размер риккетсий могут меняться в зависимости от условий роста (клетки неправильной формы, нитевидные). В мазках и тканях их окрашивают по методу Романовского-Гимза или по П.Ф. Здродовскому.

Извитые:

- *вибрионы* (от лат. *vibrio* - изогнутый, трепещущий) – подвижные бактерии изогнутой формы, напоминают запятую;

- *спириллы* – бактерии в виде спирально извитых палочек с 4-6 разветвлениями на концах, передвигаются с помощью жгутиков;

- *спирохеты* - спирально извитые палочки, напоминают штопор. Не имеют жгутиков, но обладают подвижностью, обусловленной «сгибательными» изменениями клеток, передвигаются змееобразно или толчками. Плохо воспринимают красители. Окрашиваются по методу Романовского-Гимза или серебрением. В живом виде их исследуют с помощью фазово-контрастной или темнопольной микроскопии.

Морфология грибов

Грибы (*Fungi, Mycetes*) - разнородная группа эукариотных микроорганизмов. Грибы имеют ядро с ядерной оболочкой, цитоплазму с органеллами, цитоплазматическую мембрану, мощную клеточную стенку из глюкана, целлюлозы, хитина, белка, липидов и др.

Грибы состоят из длинных тонких нитей (гиф), сплетающихся в грибницу, или мицелий. Гифы низших грибов (*фикомицетов*) не имеют перегородок. У высших грибов (*эумицетов*) гифы разделены перегородками; их мицелий многоклеточный. Эумицеты представлены *аскомицетами* и *базидиомицетами* (совершенные грибы), а также *дейтеромицетами* (несовершенные грибы).

К аскомицетам относятся представители родов *Aspergillus*, *Penicillium* и др. Представителями аскомицетов являются и дрожжи - одноклеточные грибы, утратившие способность к образованию истинного мицелия. Дрожжи имеют овальную форму клеток, диаметр которых 3-15 мкм. Они размножаются почкованием, бинарным делением (делятся на две равные клетки) или половым путем с образованием *аскоспор*.

Для обнаружения дрожжевых клеток материал исследуют в нативных и окрашенных препаратах. Жидкий материал просматривают в неокрашенном состоянии в одной из просветляющих жидкостей:

- в смеси спирта с глицерином (этиловый спирт 1 ч., глицерин – 2 ч., дистиллированная вода – 2 ч.) и растворе Люголя (1 г кристаллического йода, 2 г калия йодида, 150 мл воды);

- в воде;

- в физиологическом растворе.

Приготовление нативного (неокрашенного) препарата дрожжей. На предметное стекло бактериологической петлей или пипеткой наносят каплю материала, затем 1-2 капли просветляющей жидкости, накрывают покровным стеклом и микроскопируют с сухими объективами.

Результат. При малом увеличении 1:80 (окуляр $\times 10$ и объектив $8\times$) видны скопления дрожжевых клеток. При увеличении 1:400 (окуляр $\times 10$ и объектив $40\times$) можно наблюдать отдельные клетки. Они должны быть равномерной величины, с тонкой оболочкой, однородной или мелкозернистой цитоплазмой, небольшими вакуолями.

При производстве хлеба и хлебобулочных изделий широко применяются прессованные дрожжи. Их качество зависит от физиологического состояния микроорганизмов, в частности от жизнеспособности дрожжевых клеток. Методы выявления мертвых клеток дрожжей основаны на различной проницаемости клеточной стенки. В живые клетки красители проникают плохо. Мертвые клетки, наоборот, хорошо адсорбируют краситель. Для определения

мертвых клеток дрожжей известны *фотометрический метод* с использованием красителя конго-красный, который адсорбируется в мертвых клетках, повышая плотность дрожжевой суспензии с преобладанием нежизнеспособных клеток, *методы люминесцентной микроскопии* с использованием флюоресцирующего красителя примулина, который, накапливаясь в мертвых клетках, вызывает ярко-желтую флюоресценцию. В хлебопекарной и дрожжевой промышленности количество мертвых клеток дрожжей обычно учитывают путем окрашивания пробы дрожжей слабым водным раствором метиленовой сини по Финку.

Определение числа живых и мертвых клеток дрожжей (окраска по Финку). Для этого на предметное стекло наносят каплю исследуемой суспензии дрожжей и 1-2 капли раствора метиленового синего (рН 4,6). Препарат покрывают покровным стеклом и через 2-3 минуты в 10 полях зрения подсчитывают общее количество дрожжевых клеток и количество окрашенных клеток. При микроскопировании пользуются объективом 40х и окуляром х15. Содержание мертвых клеток дрожжей вычисляют в процентах.

Результат. В хороших дрожжах содержится не более 10 % мертвых клеток.

Лабораторная работа 5.1 (№ 6) - Изучение морфологии шаровидных и палочковидных бактерий

Цель работы. Изучить основные формы бактериальных клеток и методы их окрашивания.

Материалы и оборудование. Микроскоп, готовые фиксированные окрашенные препараты бактерий, иммерсионное масло, предметные и покровные стекла, пинцеты, бактериологическая петля, спиртовка, этиловый спирт, спички, карандаш по стеклу, столик для окраски мазков, пипетки объемом 1 и 2 см³, дистиллированная вода, чистые культуры бактерий, красители (кристаллвиолет, фуксин Циля, метиленовый синий, основной фуксин, карболовый фуксин, малахитовый зеленый), раствор Люголя.

Задание студентам

1. Просмотреть готовые препараты фиксированных окрашенных бактерий, изучить под иммерсией и зарисовать.
2. Приготовить фиксированный окрашенный препарат шаровидных форм бактерий (род *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*), изучить и зарисовать.
3. Приготовить фиксированный окрашенный препарат палочковидных форм бактерий (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*), изучить и зарисовать.

Лабораторная работа 5.2 (№ 7) – Изучение морфологии извитых форм бактерий

Цель работы. Изучить морфологию спирохет в препарате из зубного налёта при окрашивании негативным методом по Бурри.

Материалы и оборудование. Микроскоп, предметные стекла, покровные стекла, пинцет, стерильные палочки, бактериологическая петля, спиртовка, спички, карандаш по стеклу, столик для окраски мазков, пипетки объемом 1 см³ и 2 см³, дистиллированная вода, черная тушь, этиловый спирт, иммерсионное масло.

Задание студентам

1. Приготовить мазок из зубного налета, взятого стерильной палочкой. Нанесение на сухой мазок раствор негативного красителя (жидкая тушь, конго красный), смешать с пробой зубного налета, распределить по стеклу тонким слоем, высушить на воздухе.
2. Приготовить препарат из зубного налета, взятого стерильной палочкой, вторым способом: пробу зубного налета нанести на предметное стекло, смешать с красителем непосредственно на предметном стекле, накрыть покровным стеклом.

3. Оба препарата рассмотреть в микроскоп. На темном фоне туши видны неокрашенные большая и малая зубные спирохеты - *Spirochaeta macrodenta* и *Spirochaeta microdenta*.

4. Описать ход выполнения работы, записать результат и зарисовать извитые бактерии.

Лабораторная работа 5.3 (№8) – Изучение морфологии споровых микроорганизмов, микобактерий и актиномицетов

Цель работы. Ознакомиться с морфологией споровых микроорганизмов, микобактерий и актиномицетов.

Материалы и оборудование. Микроскоп, готовые препараты споровых микроорганизмов, микобактерий и актиномицетов, иммерсионное масло для микроскопии.

Задание студентам

1. Просмотреть готовые бактериальные препараты споровых микроорганизмов, микобактерий и актиномицетов в иммерсионной системе.
2. Зарисовать каждый препарат в тетрадь.
3. Приготовить фиксированный препарат из живых клеток бифидобактерий.
4. Окрасить препарат по Граму, изучить под иммерсией, зарисовать.
5. Описать отношение бифидобактерий к окраске по Граму. Бифидобактерии окрашены в фиолетовый цвет, следовательно они относятся к Гр⁺ или Гр⁻ бактериям?

Лабораторная работа 5.4 (№9) – Изучение морфологии дрожжевых клеток

Цель работы. Освоить методику приготовления нативных препаратов дрожжей, изучить их форму, размеры, строение. Освоить метод определения живых и мертвых клеток дрожжей с использованием метиленовой сини.

Материалы и оборудование. Микроскоп, предметные и покровные стекла, пинцет, бактериологическая петля, спиртовка, этиловый спирт, спички, ка-

рандаш по стеклу, столик для окраски мазков, пипетки объемом 1 и 2 см³, дистиллированная вода, чистые культуры дрожжей, красители (кристаллвиолет, метиленовый синий, основной фуксин, карболовый фуксин, малахитовый зеленый), раствор Люголя, иммерсионное масло.

Задание студентам (первое)

В соответствии с описанием приготовления нативных (неокрашенных) препаратов в теоретической части выполните следующее задание:

1. Приготовить нативный (неокрашенный) препарат дрожжевой суспензии.
2. Нанести 1-2 капли просветляющей жидкости (воды или физиологического раствора), покрыть покровным стеклом.
3. Изучить под микроскопом с сухими объективами.
4. Результат записать и зарисовать в тетрадь.

Задание студентам (второе)

В соответствии с описанием в теоретической части методов выявления живых и мертвых клеток дрожжей необходимо выполнить следующие задания:

1. На предметное стекло нанести каплю исследуемой суспензии дрожжей.
2. В каплю суспензии дрожжей внести 1-2 капли раствора метиленовой сини.
3. Препарат покрыть покровным стеклом.
4. Через 2-3 мин микроскопировать препарат с объективом 40х и окуляром х15.
5. В 10 полях зрения подсчитать общее количество дрожжевых клеток и количество окрашенных клеток.
6. Содержание мертвых клеток дрожжей вычислить в процентах.
7. Результат записать тетрадь. Сделать заключение о качестве исследованных дрожжей.

Вопросы для самоконтроля

1. Распространение дрожжей в природе?
2. К какому классу микроорганизмов относятся дрожжи?
3. Какую форму имеют клетки дрожжей?
4. Как размножаются дрожжи?
5. Как можно определить процентное содержание мертвых клеток дрожжей?
6. Зачем необходимо знать содержание живых и мертвых клеток дрожжей?

Занятие 6. Морфология клеточных структур микроорганизмов

Цель занятия. Ознакомиться с методами окрашивания и выявления клеточных структур и кислотоустойчивости бактерий.

Клеточная стенка. Тонкую структуру клеточной стенки хорошо видно лишь в электронном микроскопе. Для наблюдения клеточной стенки в световом микроскопе применяют метод темного поля либо специальную окраску, с помощью которой удастся легко выявить границы между отдельными клетками, расположенными в виде длинных нитей или плотных агрегатов. На обезжиренном стекле делают мазок клеток исследуемых бактерий, высушивают его на воздухе и фиксируют в течение 5 мин 5%-ным раствором фосфорномолибденовой кислоты. Затем препарат промывают водой и окрашивают 0,02%-ным раствором кристаллвиолета не более 15 мин. Препарат снова промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой. Клеточная стенка окрашивается в черный цвет, а цитоплазма - в бледно-сиреневый.

Выявление кислотоустойчивости. Кислотоустойчивость - свойство, характерное для некоторых микобактерий и нокардий. Оно заключается в сохранении окраски клетками этих бактерий при обработке их кислотой. Наибольшее распространение получил способ выявления кислотоустойчивости по Циль-Нильсену. На обезжиренном предметном стекле готовят два мазка: исследуемых клеток и клеток кислотоустойчивых микобактерий. Пре-

парат высушивают на воздухе и фиксируют над пламенем горелки. На мазки помещают фильтровальную бумагу, заливают препарат карболовым фуксинном Циля и затем 2 - 3 раза подогревают его до появления паров, держа стекло высоко над пламенем горелки. При появлении паров препарату дают остыть, снимают фильтровальную бумагу, сливают краситель и мазок промывают водой. Затем препарат обесцвечивают 5%-ным раствором серной кислоты (H_2SO_4). Для этого предметное стекло погружают 2 - 3 раза в стакан с кислотой, не задерживая его в ней. Препарат вновь тщательно промывают водой и докрашивают 3-5 мин метиленовым синим по Леффлеру. Краску сливают, препарат промывают водой, высушивают и исследуют в иммерсионной системе. При строгом соблюдении режима окраски кислотоустойчивые клетки приобретают красный цвет, некислотоустойчивые - синий.

Нуклеоид. Довольно четко нуклеоид обнаруживается у следующих бактерий: *Proteus vulgaris*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*. На предметном стекле делают мазок суточной культуры бактерий, высушивают его на воздухе и фиксируют в течение 2 - 3 мин в парах осмиевой кислоты. С этой целью на дно чашки Петри наносят 2 - 3 капли фиксатора, а предметное стекло помещают мазком вниз на обрезки стекла. По окончании фиксации препарат опускают на 2 - 3 мин в стаканчик с раствором 1 н HCl для гидролиза рибосомальной РНК. Стакан держат на водяной бане при 60° С. После гидролиза препарат немедленно промывают водой. Затем мазок помещают на 15 мин в 1%-ный раствор формалина, вновь промывают водой и окрашивают в течение 1 - 2 мин 0,1 - 1,0%-ным раствором основного фуксина. Препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют под иммерсией. Цитоплазма окрашивается в розовый цвет, нуклеоид - в ярко-малиновый.

Эндоспоры. Эндоспоры образуют бактерии родов *Bacillus*, *Clostridium* и др. Для обнаружения способности клеток к спорообразованию лучше использовать старые культуры. Споры можно обнаружить при наблюдении жи-

вых клеток, а также путем дифференциального окрашивания цитоплазмы и споры. В случае выявления у микроорганизма способности к образованию спор необходимо обратить внимание на тип спорообразования (бациллярный, клостридиальный, плектридиальный), расположение споры в клетке (центральное, эксцентральное или полярное), форму свободных спор (круглая, овальная или продолговатая) и определить их размеры. С этой целью просматривают клетки 2 - 3 -суточной культуры, так как большинство спорообразующих бактерий проходят за этот период времени все стадии развития - от вегетативной клетки до свободной споры.

Наблюдение спор в живых клетках. Споры по сравнению с цитоплазмой характеризуются более высоким показателем преломления света, поэтому при микроскопировании в светлом поле они видны как более темные включения округлой или овальной формы. При использовании фазово-контрастного устройства споры имеют вид светлых включений на фоне почти черных клеток.

Метод выявления спор негативным окрашиванием. На предметном стекле готовят тонкий мазок клеток спорообразующих бактерий, подсушивают на воздухе и фиксируют в пламени спиртовки. Затем на 3 - 5 мин наносят метиленовый синий или на 1 - 3 мин фуксин, после чего препарат осторожно просушивают на воздухе. Просматривают с иммерсией.

Результат. Вегетативные клетки бактерий прокрашиваются, а споры, имеющие многослойную, труднопроницаемую оболочку - нет. Они видны как сильно преломляющие свет сферические или овальные образования, находящиеся в зависимости от стадии спорообразования внутри или вне клеток бактерий.

Метод удобен при количественной оценке процесса спорообразования путем подсчета количества спор и вегетативных клеток в разных условиях роста бактерий.

Дифференциальная окраска спор по методу Пешкова. Споры и цитоплазму окрашивают при нагревании. Промывание препарата водой ведет к обесцвечиванию цитоплазмы, тогда как спора прочно удерживает краситель.

На обезжиренном предметном стекле готовят мазок, высушивают его на воздухе, фиксируют в пламени горелки и заливают раствором метиленового синего по Леффлеру. Краситель доводят до кипения, держа предметное стекло над пламенем горелки. По мере испарения красителя добавляют новые его порции. Продолжительность окраски, считая с момента закипания красителя, 10 - 20 с. Затем предметное стекло охлаждают, препарат тщательно промывают водой, после чего клетки в течение 30 с докрасивают 0,5%-ным водным раствором нейтрального красного или сафранина. Краситель сливают, препарат промывают водой и просматривают с иммерсионной системой.

Вместо метиленового синего можно использовать малахитовый зеленый. В этом случае препарат, фиксированный в пламени горелки, заливают на 7 - 10 мин 7,5%-ным раствором малахитового зеленого. Окрашивание проводят с подогревом, помещая препарат над сосудом с кипящей водой или над пламенем горелки. По окончании окраски предметное стекло охлаждают, промывают препарат водой и докрасивают клетки 0,25%-ным водным раствором сафранина в течение 1 - 2 мин.

Результат. При правильном окрашивании по Леффлеру клетки имеют красный цвет, споры - синий. При окрашивании малахитовым зеленым споры окрашиваются в зеленый цвет, клетки - в розовый.

Окраска капсулы. Эти структуры часто имеют консистенцию геля и плохо видны при микроскопировании живых клеток. Химический состав капсул у разных бактерий неодинаков, поэтому их нельзя выявить каким-либо одним методом окраски. Кроме того, капсулы при окраске легко деформируются, а вещество капсулы слабо связывает краситель, который легко отмывается в процессе обработки препарата. Чаще всего для выявления кап-

сул применяют способ «негативной» окраски (негативного контрастирования) с помощью жидкой туши. Для этого небольшое количество клеток с плотной среды помещают в каплю разбавленного фуксина, смешивают с каплей туши, закрывают покровным стеклом и просматривают с объективом 40х.

Результат. На общем темном фоне препарата хорошо видны бесцветные капсулы, окружающие клетки микроорганизмов, окрашенные в розовый цвет.

Окраска капсул по методу Гинса. На конец предметного стекла микробиологической петлей наносят каплю черной туши, вносят в нее клетки, хорошо перемешивают и ребром покровного стекла делают мазок по всей поверхности стекла. Мазок высушивают на воздухе и фиксируют 5 - 10 мин смесью Никифорова или 3 мин абсолютным метанолом. Далее мазок окрашивают карболовым фуксином Циля, разбавленным водой в соотношении 1:3. Время окрашивания 2 - 3 мин. Препарат промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют в иммерсионной системе.

Результат. На темно-сером фоне препарата контрастно выделяются розово-малиновые клетки бактерий, окруженные бесцветными капсулами.

Приготовление туши. Одну часть туши смешивают с 9 частями дистиллированной воды и стерилизуют при 1 атм 30 мин в пробирках, закрытых ватными пробками. Вместо стерилизации можно добавлять к туши несколько капель формалина. Подготовленную таким образом тушь выдерживают две недели, пока все взмученные частицы не осядут на дно. Для приготовления препарата осторожно берут только верхнюю часть отстоявшейся жидкости.

Экспресс-метод определения грам-типа микроорганизмов. Метод основан на разрушении клеток грамотрицательных бактерий в щелочной среде и определении свободной ДНК. Для этого на предметное стекло наносят каплю 3%-ного раствора КОН и 1 петлю 24-часовой исследуемой агаровой куль-

туры, тщательно перемешивают. При тестировании грамтрицательных культур через 5 - 7 с при движении петли вверх образуется слизистый след длиной 1 -2 см. Если слизь не образуется, то тестируемая культура грамположительная.

Лабораторная работа 6.1 (№10) - Окраска бактерий по Граму

Цель работы. Ознакомиться с техникой окраски бактерий по Граму.

Материалы и оборудование. Микроскоп, предметные стекла, бактериологическая петля, спиртовка, чистые предметные стекла, столик для окрашивания препаратов, промывалка с водой, красящая бумага с кристаллвиолетом или 1%-ный раствор кристаллвиолета или генцианвиолета, раствор Люголя, 96%-ный этанол, 0,1%-ный раствор фуксина или раствор Пфейффера, чистые культуры контрольных (с известным типом окраски) грамположительных и грамтрицательных бактерий и исследуемые микроорганизмы, иммерсионное масло.

Задание студентам

1. Приготовить на одном предметном стекле три фиксированных мазка бактерий:

- а) контрольной грамтрицательной культуры с одного конца стекла;
- б) контрольной грамположительной культуры с другого конца стекла
- в) исследуемой культуры в центре стекла.

Мазки должны быть тонкими, клетки бактерий должны быть равномерно распределены на стекле, иначе окрашивание будет неправильным.

2. Мазки окрасить кристаллвиолетом в течение 2-3 мин.

3. Залить мазки раствором Люголя на 2 мин. до почернения препарата.

4. Смыть раствор Люголя 96%-ным этиловым спиртом, погружая стекло с мазками в стакан со спиртом на 30 с или промывая препарат спиртом из пипетки в течение 30 с.

5. Тщательно промыть мазки водой (предпочтительно дистиллированной).

6. Нанести на мазки 0,1%-ный раствор фуксина или раствор Пфейффера на 2 мин.

7. Через 2 мин мазки тщательно промыть водой, высушить фильтровальной бумагой и просмотреть препараты в иммерсионной системе.

9. Зарисовать каждый препарат в альбом.

Результат. Грамположительные бактерии окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, грамотрицательные - в красный или розовый цвет.

Лабораторная работа 6.2 (№ 11) - Экспресс-метод определения грам- типа микроорганизмов

Цель работы. Ознакомиться с техникой определения грам-типа микроорганизмов.

Материалы и оборудование. Микроскоп, предметные стекла, бактериологическая петля, спиртовка, чистые предметные стекла, чистые культуры контрольных (с известным типом окраски) грамположительных и грамотрицательных бактерий и исследуемые микроорганизмы, 3%-ный раствор едкого калия (КОН).

Задание студентам

1. На одно предметное стекло нанести две капли 3%-ного раствора едкого калия (КОН). В первую каплю внести бактериологической петлей контрольную грамположительную культуру, во вторую - грамотрицательную контрольную культуру.

2. Тщательно перемешать заведомо известную Гр⁺ культуру бактерий с раствором КОН в первой капле, через 5 - 10 с медленно приподнять бактериологическую петлю и убедиться, что вязкость капли не изменилась, слизь не образуется, проба отрицательная. Это подтверждает, что исследуемая культура является грамположительной.

3. Тщательно перемешать заведомо известную Гр⁻ культуру бактерий с раствором КОН во второй капле, через 5 - 10 с медленно приподнять бактериологическую петлю на высоту 2 - 3 см. Образовавшаяся слизь свидетельствует

о том, что раствор КОН разрушает бактериальную клеточную стенку Гр-, ДНК остается свободной (слизистое образование), т.е. проба положительная. Это подтверждает, что исследуемая культура является грамотрицательной.

4. Определить экспресс-методом грам-тип культур, предложенных преподавателем.
5. Результаты исследования записать в тетрадь.

Лабораторная работа 6.3 (№ 12) - Окраска капсул бактерий по методу Гинса

Цель работы. Освоить методику окрашивания капсул по методу Гинса.

Материалы и оборудование. Микроскоп, предметные и покровные стекла, бактериологические петли, спиртовка, столик для окрашивания препаратов, сосуд с водой для промывания, полоски фильтровальной бумаги, черная тушь, смесь Никифорова, карболовый фуксин Циля, дистиллированная вода, чистые культуры бактерий, готовые препараты капсульных форм бактерий, иммерсионное масло для микроскопии.

Задание студентам

1. Просмотреть готовые фиксированные окрашенные препараты, предложенные преподавателем, в иммерсионной системе, зарисовать.
2. Приготовить фиксированный окрашенный препарат в соответствии с описанием в теоретической части.
3. Изучить приготовленный препарат в иммерсионной системе, зарисовать.

Лабораторная работа 6.4 (№ 13) - Окраска спор бактерий

Цель работы. Освоить метод окраски спор бактерий.

Материалы и оборудование. Микроскоп, предметные стекла, бактериологические петли, спиртовка, столик для окрашивания препаратов, сосуд с водой для промывания препаратов, 0,5%-ный водный раствор сафранина, раствор метиленового синего по Леффлеру или малахитовый зеленый, дистиллированная вода, чистые культуры спорообразующих бактерий (*Bacillus subtilis*,

Bacillus cereus), готовые препараты спорных форм бактерий, иммерсионное масло.

Задание студентам

1. Приготовить фиксированный мазок чистой культуры спорообразующих бактерий.
2. Налить на предметное стекло с мазком один из красителей: раствор метиленового синего по Леффлеру или малахитового зеленого.
3. Зажечь спиртовку. Держа предметное стекло пинцетом над пламенем горелки, осторожно довести краситель до кипения. По мере испарения красителя добавить новые порции красителя. Продолжительность окраски трехкратная по 10-15 с.
4. Охладить стекло, препарат тщательно промыть водой.
5. Для докрасивания препарата нанести на мазок 0,5%-ный водный раствор сафранина на 30 с.
6. Промыть препарат водой и высушить фильтровальной бумагой.
7. Просмотреть готовый препарат спорной культуры, представленный преподавателем, в иммерсионной системе.
8. Просмотреть приготовленный Вами препарат спорной культуры в иммерсионной системе.
9. Все препараты зарисовать в альбом.

Результат. При правильном окрашивании вегетативные клетки окрашены в красный цвет, споры - в синий (при окрашивании раствором метиленового синего по Леффлеру) или в зеленый цвет (при окрашивании раствором малахитового зеленого).

Вопросы для самоконтроля

1. Функции капсулы бактерий, ее химический состав, строение?
2. Методы окраски бактериальных капсул.
3. Методы окраски клеточной стенки.

4. Принцип окраски бактерий по Граму.
5. Окраска бактерий для определения их кислотоустойчивости.
6. Методы окраски нуклеоида у бактерий.
7. Цель спорообразования у бактерий, строение спор, расположение в клетке, функции.
8. Методы окрашивания спор.

Раздел 2. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ СЫРЬЯ И ГОТОВОЙ ПРОДУКЦИИ

Занятие 7. Оценка качества пищевой продукции по микробиологическим показателям

Цель занятия. Ознакомление с основными микробиологическими показателями, используемыми для выяснения потенциальной опасности продукта питания для людей.

В разделе *Общая микробиология* показано назначение микробиологической лаборатории, её оснащение, требования и правила работы в ней, показаны основные группы микроорганизмов, методы их культивирования (*выращивания*) в искусственных условиях. Это указывает на возможности учебной лаборатории с минимумом оборудования проведения со студентами ряда основных лабораторных работ по определению качества продовольственного сырья и пищевых продуктов по микробиологическим показателям.

Продовольственное сырье и пищевые продукты почти всегда в значительной степени обсеменены различными микроорганизмами. Микрофлора пищевых продуктов динамично связана с внешней средой. Поэтому всегда необходимо учитывать нормальное течение микробиологических процессов и изменения, которые вызывает в продукте необычная для него микрофлора, попадающая при нарушении условий выработки и хранения продукта. Микроорганизмы ухудшают качество продуктов, снижают их стойкость при хра-

нении, наносят ущерб здоровью человека. При микробиологическом исследовании выясняется возможная опасность продукта для людей, т.е. присутствие в нем патогенных (болезнетворных) микроорганизмов.

При характеристике продовольственных товаров выясняют их микробиологическую стойкость. Понятие «*микробиологическая стойкость*» подразумевает потенциальные возможности сохранения продукта без порчи. Для оценки качества пищевых продуктов, условий их производства и хранения используют количественные и качественные микробиологические показатели.

Количественные микробиологические показатели указывают общее число микроорганизмов в 1 г (1 см³) продукта. Основным количественным тестом является **КМАФАнМ** – количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в 1 г (1 см³) продукта. В других случаях норматив отражает количество колониеобразующих единиц в 1 г (мл) продукта (КОЕ/г, мл).

КМАФАнМ может свидетельствовать об общем санитарно-эпидемиологическом состоянии продукта, свежести или начальной стадии порчи внешне доброкачественного продукта, о нарушении технологических режимов при производстве, о вторичном загрязнении, о стойкости продукта при хранении. Для многих продуктов КМАФАнМ нормируется. Стойкость пищевых продуктов при хранении оценивают также по количеству микроорганизмов порчи (дрожжи и плесневые грибы).

Качественные микробиологические показатели указывают на отсутствие (или присутствие) конкретных патогенных и условно-патогенных микробов в определенной массе продукта. Их определение проводят для прогнозирования порчи продукта и безопасности для здоровья человека. Обнаружение патогенных и условно-патогенных микробов (*сальмонелл, золотистого стафилококка, протей, дополнительно – клостридий ботулинум, клостридий перфрингенс, бациллюс цереус и др.*) и их ядов проводят в соответствии

с действующими нормативными документами. По ГОСТу патогенные микроорганизмы и их токсины должны отсутствовать в определенной массе (объеме) исследуемого материала.

Но прямое выявление патогенных микробов в продуктах затруднительно (небольшие концентрации, дорогостоящие питательные среды, длительные сроки культивирования). Поэтому для их обнаружения применяют косвенные методы, с помощью которых выявляют загрязнение исследуемого продукта выделениями человека и животных.

Применение косвенных методов связано с тем, что для многих видов микробов (обитателей тела здорового человека) полость рта или кишечник являются биотопом – единственной природной средой обитания. При обнаружении таких микробов вне организма можно делать заключение о наличии фекального загрязнения исследуемого объекта и возможной опасности присутствия в нем брюшнотифозных, дизентерийных палочек, возбудителей других кишечных инфекций. Выделяемые в этих случаях микробы служат показателями санитарного неблагополучия, потенциальной опасности исследуемых объектов, а потому названы «санитарно-показательными». Однако не все микроорганизмы, входящие в состав нормальной микрофлоры человека и животных, могут быть признаны санитарно-показательными.

Длительными исследованиями установлено, что санитарно-показательные микроорганизмы должны отвечать следующим требованиям:

- они должны постоянно содержаться в выделениях человека и теплокровных животных и поступать в окружающую среду в больших количествах;

- они не должны иметь другого природного резервуара, кроме организма человека и теплокровных животных;

- после выделения в окружающую среду они должны сохранять жизнеспособность в течение сроков, близких к срокам выживания патогенных микробов, выводимых из организма теми же путями;

- они не должны размножаться в окружающей среде;
- они не должны значительно изменять свои биологические свойства в окружающей среде;
- они должны быть достаточно типичными, их дифференциация должна осуществляться без особого труда;
- индикация, идентификация и количественный учет должны производиться современными, простыми, легко доступными и экономичными микробиологическими методами.

Следовательно, **санитарно-показательные микроорганизмы** – это такие микроорганизмы, которые постоянно находятся в естественных полостях тела человека или животного и не обитают во внешней среде. Присутствие санитарно-показательных микроорганизмов в исследуемых объектах внешней среды указывает на загрязнение их выделениями человека и животных. Чем больше санитарно-показательных микроорганизмов в исследуемом продукте, тем большая вероятность присутствия в нем патогенных микроорганизмов - специфических возбудителей инфекционных болезней.

Санитарно-показательные микроорганизмы делят на две группы.

1-я группа: мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (**МАФАНМ**) – это микроорганизмы, оптимальная температура роста которых 25 – 40° С в условиях доступа кислорода либо его отсутствия. Показателем санитарного состояния продукта является общая обсемененность МАФАНМ, т.е. общая численность микроорганизмов.

2-я группа: бактерии группы кишечной палочки (**БГКП**). БГКП включают все разновидности кишечной палочки. БГКП очень изменчивы и, попадая во внешнюю среду, утрачивают многие характерные признаки. Обнаружение кишечной палочки (эшерихии коли - *E. coli*) в исследуемом продукте выявляет нарушение технологического режима его получения. Эшерихии коли быстро погибают даже при щадящих режимах термической обработки, поэтому их присутствие в продукте указывает на явные нарушения процесса

приготовления продукта и нельзя гарантировать, что в данном продукте не содержатся другие, более опасные, чем кишечная палочка, микроорганизмы. При санитарно-гигиенической оценке продукта важно не только установить в нем наличие кишечной палочки, но и знать её численность. Для этого определяют её коли-титр и коли-индекс.

Коли-титр - это наименьший объем (или масса) исследуемого материала, в котором обнаружена хотя бы одна клетка *E. coli*.

Коли-индекс - это количество бактерий в 1 л или 1 кг исследуемого материала.

Вопросы для самоконтроля

1. Что означает понятие «микробиологическая стойкость» продукта?
2. С какой целью проводят оценку качества пищевых продуктов?
3. Какие количественные и качественные микробиологические показатели используют для оценки качества пищевых продуктов?
4. Какие микробиологические показатели относятся к количественным показателям и почему?
5. Какие микробиологические показатели относятся к качественным и почему?
6. Дайте определение санитарно-показательным микроорганизмам?
7. О чем свидетельствует наличие санитарно-показательных микроорганизмов в продуктах питания?
8. Почему не используют методы прямого выявления патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах?
9. Что такое коли-титр?
10. Что такое коли-индекс?

Занятие 8. Методы определения некоторых групп микроорганизмов

Цель занятия. Изучить методы определения основных микробиологических показателей, используемых для оценки безопасности пищевых продуктов

Метод 1. *Определение общего количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ)*

Метод распространяется на пищевые продукты, которые содержат в 1 г 300 и более или в 1 мл 30 и более микроорганизмов и устанавливает порядок определения жизнеспособных клеток МАФАнМ.

Метод предусматривает высев определенного количества продукта (*или его разведений*) на питательную среду, культивирование посевов в аэробных условиях при 30° С в течение 72 ч, подсчет выросших видимых колоний МАФАнМ и пересчете их количества на 1 г (мл) продукта.

Масса (*объем*) навески для приготовления исходного разведения составляет не менее 10 г (мл), а предназначенная для непосредственного высева на питательные среды – не менее 1 г (мл).

Методика выполнения. По 1 мл продукта или его разведений высевают одновременно в две стерильные чашки Петри. После этого в каждую чашку Петри с посевом добавляют не более чем через 15 мин расплавленную и охлажденную до 45° С плотную питательную среду. Среду немедленно и равномерно перемешивают с посевным материалом. Для этого чашки Петри осторожно передвигают круговыми движениями по поверхности стола и оставляют до застывания. После застывания среды с агаром и посевом чашки Петри дном вверх помещают в термостат при температуре 30° С на 72 ч для инкубирования.

Результат оценивают по каждой пробе отдельно. На чашках, где выросло от 30 до 300 колоний, подсчитывают все колонии, суммируют и находят среднее арифметическое числа колоний, которое округляют:

- если меньше 100, его округляют до ближайшего числа, которое делится на 5;
- если больше 100 и его последняя цифра 5, округляют до ближайшего числа, которое делится на 20;
- если больше 100 и его последняя цифра не 5, округляют до ближайшего числа, которое делится на 10.

Количество микроорганизмов в 1 г продукта вычисляют умножением округленного числа среднего арифметического числа колоний на разведение навески и делением на количество вносимого посевного материала (масса, объем) в чашку Петри. Например, округленное среднее арифметическое число колоний с двух чашек, засеянных по 1 мл из 3-го разведения (1:1000), равнялось 220. В этом случае, общее число микроорганизмов в 1 г (мл) продукта будет равно

$$X = (220 \times 1000) : 1 = 220\,000$$

Общее количество микроорганизмов записывают в виде числа (от 1 до 9,9) $\times 10$. Так, 220 000 клеток в 1 г записывают $2,2 \times 10^5$ КОЕ/г.

Метод 2. Определение бактерий группы кишечной палочки (БГКП) посевом в жидкие среды

Метод распространяется на пищевые продукты, не содержащие в 1 г (мл) или содержащие в 1 г (мл) менее 1000 колиформных бактерий, и устанавливает порядок определения наиболее вероятного числа (НВЧ) жизнеспособных клеток колиформных бактерий. Колиформные бактерии – это граммотрицательные палочки, ферментирующие лактозу при 30 - 37° С в течение 24 – 48 ч с образованием кислоты и газа.

Метод основан на высеве определенного количества продукта и/или его разведений в ряд пробирок с жидкой селективно-диагностической средой с лактозой, культивировании в аэробных условиях при 30° С в течение 24 – 48

ч, учете положительных пробирок и определении наиболее вероятного числа в 1 г (мл) продукта колиформных бактерий, ферментирующих лактозу с образованием кислоты и газа.

Масса (объем) навески для приготовления исходного разведения должна быть не менее 10 г (мл), а для высева в питательные среды – не менее 1 г (мл). Из навески продукта готовят исходное разведение и ряд 10-кратных разведений до такой степени, чтобы окончательное разведение давало отрицательный результат.

Методика выполнения. По 1 мл разведений и (если необходимо) по 1 г продукта высевают параллельно в три пробирки, содержащие по 9 мл накопительной среды Кесслера. Посевы инкубируют при 30° С в течение 48 ч. Пробирки просматривают через 24 ч и регистрируют те из них, в которых отмечен рост микроорганизмов (*помутнение среды, образование любого количества газа, изменение цвета, другие признаки*). Через 48 ч проводят окончательный учет: отмечают пробирки, где имеет место рост микроорганизмов и используют их для дальнейшего исследования.

Из каждой пробирки с признаками роста микроорганизмов делают пересевы бактериологической петлей на плотные диагностические среды. При определении БГКП используется среда Эндо. Одну чашку Петри используют для высева одновременно трех пробирок, разделив дно чашки на секторы. Посевы делают так, чтобы получить рост изолированных колоний. Посевы помещают в термостат при 37° С на 24 ч.

Результат. Через 24 ч посевы просматривают, отмечают рост колоний, характерных для БГКП: на среде Эндо – плоские или слегка выпуклые с валиком, красные с различной интенсивностью окраски, с металлическим или без металлического блеска. Из подозрительных колоний делают фиксированные препараты, окрашивают по Граму и микроскопируют. При обнаружении грамтрицательных палочек считают, что в продукте присутствуют БГКП.

Результат записывают: «обнаружены (или не обнаружены) БГКП в анализируемой массе продукта».

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое КМАФАнМ и БГКП?
2. Какой метод используется для определения КМАФАнМ?
3. Какой метод используется для определения БГКП?
4. О чем свидетельствует обнаружение в продуктах питания КМАФАнМ и БГКП?

Раздел 3. СПЕЦИАЛЬНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Занятие 9. Микробиология молока

Цель занятия. Ознакомление с фазами развития микроорганизмов в молоке при его хранении, изучение основных микробиологических показателей качества сырого молока.

***Молоко — это изумительная пища,
приготовленная самой природой.
И. П. Павлов***

Общие сведения. Молоко является одним из самых полезных и ценных продуктов питания. В нем содержатся белки, свободные аминокислоты, молочный жир, молочный сахар, витамины А, Д, Е, С, РР, группы В, минеральные соли. Естественное предназначение молока — вскармливание детёнышей, которые еще не способны переваривать другую пищу. Молоко образуется из крови. По пищевой ценности молоко может заменить любой продукт, но ни один продукт не заменит молока. В настоящее время молоко входит в состав многих продуктов, используемых человеком, а его производство стало крупной отраслью промышленности. Химический состав молока у различных видов животных различается. Наибольшее распространение как продукт питания получило коровье молоко и продукты его переработки.

Свежесвыдоенное молоко здоровой коровы стерильно и определенный период времени (2 часа) обладает бактерицидными свойствами. *Бактерицидность* (от бактерии и лат. **caedo** — убиваю) – это способность убивать бактерии и другие микроорганизмы. Бактерицидность молока обусловлена наличием в нём ферментов (*лизоцим, пероксидаза*), иммуноглобулинов (*антител*), лейкоцитов. Известно, что выводные протоки молочных желез коровы населены сапрофитными бактериями из окружающей среды. Большая часть их погибает, благодаря бактерицидным свойствам ткани вымени. Жизнеспособными остаются наиболее стойкие группы микроорганизмов (*микрострептококки, стрептококки*). Некоторые непатогенные микробы (*сапрофиты*) попадают в молоко из почвы, из воздуха, с посуды, с вымени коровы, с рук доярок и составляют нормальную микрофлору молока, поступающего на молокоперерабатывающие предприятия и в продажу. Поэтому в нормальной микрофлоре молока преобладают микрострептококки, молочнокислые бактерии, стрептококки, сарцины, дрожжи, плесени. Обильная сапрофитная микрофлора является показателем свежести и санитарного состояния молока. Количество нормальной микрофлоры в молоке можно уменьшить при строгом контроле за санитарным состоянием молочного хозяйства, быстрым охлаждением и пастеризацией молока.

При неблагоприятных условиях содержания животных в вымя попадают болезнетворные микроорганизмы. Загрязненное молоко содержит бактерии группы кишечной палочки, стафилококки, сальмонеллы, холерные вибрионы, маслянокислые и гнилостные бактерии.

Молоко – хорошая питательная среда для микроорганизмов. В нем долго сохраняются болезнетворные микроорганизмы (*возбудители сальмонеллеза, холеры, дизентерии, бруцеллеза, туберкулеза*). Поэтому молоко может служить фактором передачи возбудителей ряда инфекционных заболеваний. Стафилококки, развиваясь в молоке, выделяют экзотоксин, вызывая у человека тяжелое пищевое отравление.

При хранении молока количество содержащихся в нем бактерий изменяется. Это зависит от температуры, сроков хранения и первоначального состава микрофлоры молока. Развитие микроорганизмов в молоке проходит несколько фаз:

- *бактерицидная фаза* характеризуется частичным отмиранием микробов в результате действия пероксидазы, лизоцима, антител, лейкоцитов. Количество микроорганизмов в молоке в течение двух часов после дойки не увеличивается, а понижается. Бактерицидная фаза зависит от бактериальной обсеменённости и температуры молока (чем выше температура, тем короче бактерицидная фаза). Если молоко после дойки сразу охладить до 4°C , продолжительность бактерицидной фазы составит 24 часа, если охладить до 0°C , продолжительность бактерицидной фазы увеличивается до 48 и более часов. рН свежего молока 6,8. Для удлинения бактерицидной фазы молоко необходимо как можно быстрее охладить до температуры $5 - 3^{\circ}\text{C}$;

- *фаза смешанной микрофлоры*, во время которой размножаются попавшие в молоко микроорганизмы. Если температура хранения молока выше $8 - 10^{\circ}\text{C}$, то уже в первые часы после бактерицидной фазы в молоке начинают развиваться мезофильные микроорганизмы;

- *фаза молочнокислых микроорганизмов*, во время которой развивается молочнокислый стрептококк с последующим его вытеснением молочнокислыми палочками. В эту фазу накапливается молочная кислота (кислотность молока повышается);

- *фаза развития дрожжей, грибов и гнилостных бактерий*. Накопившаяся молочная кислота приводит к гибели молочнокислых бактерий, начинают размножаться дрожжи, плесневые грибы, гнилостные бактерии. Они разрушают белки молока.

Молоко как правило используют для изготовления молочных продуктов (*сметана, сливочное масло, сыр, творог, кисломолочные продукты, сгущенное молоко и др.*). Поэтому санитарно-гигиеническому состоянию молока

уделяется особое внимание. Основным показателем качества сырого молока является его общая обсемененность.

Общая обсемененность молока определяется косвенным методом – по редуктазной пробе, то есть по времени восстановления индикатора (метиленовой сини или резазурина), внесенного в пробу молока. Кроме этого, в молоке определяют общее количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), бактерии группы кишечной палочки (БГКП), патогенные микроорганизмы (сальмонеллы, золотистый стафилококк).

Проба на редуктазу. В молоке содержатся различные ферменты, в том числе редуктаза. Редуктаза накапливается в молоке при размножении в нем микроорганизмов. Чем больше в молоке микроорганизмов, тем больше в нем редуктазы. Следовательно, количество редуктазы является показателем бактериальной обсемененности молока. Редуктазную пробу проводят один раз в декаду. Исследуют молоко каждого поставщика. Фермент редуктазы в молоке обнаруживается по обесцвечиванию красителей: метиленового синего или резазурина.

Реакция с метиленовым синим. При редуктазной пробе реактив метиленовый синий прибавляют в молоко, которое окрашивается в синий цвет. Фермент редуктазы обесцвечивает (*восстанавливает*) метиленовый синий. При наличии редуктазы молоко, окрашенное метиленовым синим в синий цвет, обесцвечивается.

Взятие проб. Исследуемое молоко тщательно перемешивают и стерильным черпаком отбирают 50 мл молока в стерильную посуду, закрывают стерильной ватно-марлевой пробкой.

Методика выполнения. В стерильную пробирку наливают 1 мл метиленового синего и 20 мл исследуемого молока, предварительно прогретого на водяной бане до 38 - 40° С (оптимальная температура для редуктазы). Пробу перемешивают, ставят в термостат при температуре 38 - 40° С и наблюдают за обесцвечиванием молока через 20 минут, 2 часа и 5,5 часов. Проба счита-

ется законченной при полном обесцвечивании молока. По времени обесцвечивания молоко по качеству относят к разным классам (табл. 3).

Таблица 3

Определение качества молока по времени его обесцвечивания
(редуктазная проба с метиленовой синью)

Показатели	Класс			
	1-й	2-й	3-й	4-й
Время обесцвечивания, ч	5,5	5,5 - 2	2 – 0,5	20 минут
Примерное количество бактерий, млн	0,5	0,5 - 4	4 - 20	20
Качество молока	Хорошее	Среднего качества	Плохое	Очень плохое

Свежевыдоенное молоко восстанавливает метиленовый синий медленно. С увеличением в молоке числа бактерий скорость обесцвечивания метиленового синего возрастает. По скорости восстановления метиленового синего примерно определяют численность бактерий в молоке, степень его загрязнения и качество.

Реакция с резазурином. В стерильные пробирки наливают 10 мл исследуемого молока и 1 мл 0,0005 %-ного водного раствора резазурина. Смесь тщательно перемешивают и помещают на водяную баню при 38 – 40° С. Учет результатов реакции проводят через 20 мин и через 1 ч (табл. 4). Пробирки с молоком, обесцвеченным через 20 мин, убирают, остальные находятся в водяной бане до конца опыта. Редуктазная проба с резазурином длится не более 1 ч.

Таблица 4

Определение качества молока по редуктазной пробе с резазурином

Качество молока	Количество бактерий в 1 мл молока, млн	Скорость изменения цвета, ч	Окраска молока
Хорошее	Менее 0,5	1	Сине-стальная
Удовлетворительное	От 0,6 до 4	1	Сине-фиолетовая или сиреневая
Плохое	От 4 до 20	1	Розовая или белая
Очень плохое	Более 20	20 мин	Белая

Лабораторная работа 9.1 (№ 14) - Определение микробиологических показателей молока

Цель работы. Определить качество молока косвенным методом по времени его обесцвечивания (редуктазная проба с метиленовой синью); определить количественные (КМАФАнМ) и качественные (БГКП) показатели молока методом разведений.

Материалы и оборудование. Пробы молока, водяная баня, термостат, стерильная посуда, реактивы, питательные среды.

1. Методика определения КМАФАнМ в молоке

Взятие пробы. Молоко, сливки хорошо перемешивают. В стерильную посуду с ватно-марлевой пробкой отбирают 100-200 мл продукта. Если проводится анализ расфасованного продукта, оно должно быть представлено в упаковке.

Ход работы. Из приготовленных разведений (10^{-1} - 10^{-6}) каждой пробы делают посев в две-три чашки Петри. Каждое из разведений засевают в количестве 1 мл в одну чашку Петри и заливают стерильной питательной средой (МПА), охлажденной до 40 – 45° С. Для равномерного распределения посеянного материала содержимое чашки Петри перемешивают путем легкого вращательного покачивания. После застывания МПА чашки Петри переворачивают крышками вниз и в таком виде ставят в термостат при температуре 30° С. Через 72 ч подсчитывают число выросших колоний на каждой чашке. Общее количество бактерий в 1 мл молока (или сливок) вычисляют по формуле $X = n \cdot 10^m$, где

X - КМАФАнМ (КОЕ/мл);

n - количество колоний, выросших и подсчитанных на чашках Петри;

10^m - число десятикратных разведений.

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое, полученное по всем чашкам Петри. Результаты заносят в таблицу 5,

сравнивают с нормативом (КОЕ/мл) и по числу КМАФАнМ делают вывод о фазе развития микроорганизмов и качестве молока.

Таблица 5

Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) в молоке и молочных продуктах

Наименование продукта	Норматив, КОЕ/мл	Результаты, КОЕ/мл	Вывод
<i>Молоко сырое:</i>			
-высший сорт	3×10^5		
-1-й сорт	5×10^5		
-2-й сорт	4×10^5		
<i>Молоко пастеризованное:</i>			
- группа А	5×10^5		
- группа Б	1×10^5		
- во флягах	2×10^5		
- в цистернах	3×10^5		
<i>Сливки пастеризованные:</i>			
- группа А	1×10^5		
- группа Б	2×10^5		
- во флягах	3×10^5		
<i>Молоко топленое</i>	$2,5 \times 10^5$		

2. Методика определения БГКП в молоке

Метод основан на способности БГКП сбраживать на среде Кесслера лактозу с образованием кислоты и газа. Обнаружение бактерий этой группы указывает на фекальное загрязнение молока.

Взятие пробы. Отбор проб производят аналогично определению КМАФАнМ (см. занятие 8).

Ход работы. Производят посев материала в разведениях от 0,1 до 0,00001 (10^{-1} до 10^{-5}). По 1 мл разведений продукта засевают в пробирки с 5

мл среды Кесслера. Пробирки помещают в термостат при температуре 37° С на 18-24 ч. При отсутствии в пробирках газообразования через 18-24 ч считают, что продукт не загрязнен БГКП.

При установлении в 5 – 6 пробирках газообразования производят пересев материала в чашки Петри на плотную дифференциальную среду Эндо. Если газообразование обнаружено в пробирках с большим разведением и отсутствует в пробирках с меньшим разведением, то на среду Эндо пересевают материал из пробирок с меньшим разведением. Чашки с посевами помещают крышками вниз в термостат с температурой 37° С на 18-24 ч.

Результат. При отсутствии на среде Эндо колоний, типичных для БГКП, продукт считают не загрязненным кишечной палочкой. Если в микробиологических лабораториях молочных предприятий на чашках Петри со средой Эндо обнаружены колонии БГКП, указанные чашки должны передаваться в органы Роспотребнадзора для дальнейшего изучения. Из колоний БГКП делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. При обнаружении грамтрицательных палочек материал пересевают в пробирки на среду Козера и среду с глюкозой. Пробирки помещают на 18-24 ч в термостат со средой Козера при 37° С, с глюкозой - при 43° С. Наличие кислоты и газа в среде с глюкозой и отсутствие роста на среде Козера указывает на присутствие БГКП.

При определении БГКП в молоке и молочных продуктах пользуются термином: коли-титр кишечной палочки (*титр кишечной палочки*) - это наименьшее количество исследуемого в миллилитрах продукта, в котором еще обнаруживается хотя бы одна кишечная палочка.

На основании определения титра кишечной палочки молоко по качеству подразделяют на классы (табл. 6).

Определение качества молока по коли-титру

Показатель	Класс			
	1-й	2-й	3-й	4-й
Коли-титр	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Качество молока	Хорошее	Среднее	Плохое	Очень плохое

Задание студентам

1. Отобрать пробы молока (см0 Озанятие 8).
2. Провести реакцию на редуктазу с метиленовой синью.
3. Поставить пробы в термостат.
4. Установить время обесцвечивания метиленовой сини и определить общую обсемененность молока.
5. Сравнить полученные данные с таблицей 3 «Определение качества молока по времени его обесцвечивания (редуктазная проба с метиленовой синью).
6. Провести посев разведений молока на МПА для определения КМАФАнМ.
7. Поставить пробы в термостат.
8. На следующем занятии проанализировать посеvy в чашках Петри, подсчитать колонии и подсчитать общее количество микроорганизмов по формуле, подсчитать результат в КОЕ/мл.
9. Результаты занести в таблицу 5.
10. Сравнить с нормативными показателями СанПиН.
11. Сделать выводы и записать результаты в тетрадь.
12. Дать устное разъяснение о качестве исследуемого молока.

Вопросы для самоконтроля

1. Почему молоко является питательной средой для микроорганизмов?
2. Объясните механизм проникновения микроорганизмов в молоко.
3. Как изменяется микрофлора молока при хранении?
4. Охарактеризуйте фазы молока.
5. По каким микробиологическим показателям оценивают молоко?

6. Какими методами пользуются при определении качества молока?
7. Какие Вы знаете количественные показатели качества молока и молочных продуктов?
8. Какие Вы знаете качественные показатели качества молока и молочных продуктов?
9. Цель проведения редуктазной пробы.
10. Какую роль играют патогенные микроорганизмы молока?
11. Что такое коли-титр?
12. На что указывает обнаружение бактерий группы кишечной палочки в молоке и молочных продуктах?

Занятие 10. Микробиологический анализ сметаны, сыра, сливочного масла

Цель занятия. Ознакомиться с микрофлорой молочных продуктов, содержащих большое количество жира

Микрофлора сметаны.

Сметану готовят из сливок с использованием закваски. В свежеработанной сметане содержатся молочнокислые бактерии *Streptococcus lactis*. *S. lactis* - гомоферментативная молочнокислая бактерия, является причиной естественного скисания молока. Оптимальная температура развития – 30 - 35° С. В сметане длительного хранения развиваются микроорганизмы, попадающие в продукт извне (психрофильные дрожжи, бактерии рода псевдомонас, молочная плесень). При развитии в сметане дрожжей, сбраживающих молочный сахар, может происходить вспучивание продукта и проявляться спиртовый привкус. Развитие дрожжей, разлагающих молочный жир, приводит к прогорканию сметаны.

Лабораторная работа 10.1 (№ 15) – Определение свежести сметаны

Цель работы. Освоить бактериоскопический метод определения свежести сметаны.

Материалы и оборудование. Пробы сметаны, предметные стекла, спиртовка, спички, шпатель, бактериологическая петля, метиленовый синий, песочные часы, иммерсионное масло, микроскоп.

Методика выполнения. Готовят препарат, размазывая сметану тонким слоем (без воды) на подогретом на пламени горелки стерильном предметном стекле. Мазок высушивают на воздухе, фиксируют смесью спирта с эфиром, окрашивают метиленовым синим 2 – 3 мин. Микроскопируют под иммерсией.

Результат. В свежей сметане наблюдаем соединенные попарно или в виде коротких цепочек клетки *Streptococcus lactis*.

В несвежей сметане встречаются клетки дрожжей, молочной плесени.

Задание студентам

1. Взять шпателем или бактериологической петлей пробу сметаны.
2. На предметном стекле приготовить тонкие мазки и высушить их на воздухе.
3. Зафиксировать мазки смесью спирта с эфиром (1:1).
4. Окрасить препарат метиленовым синим.
5. Подготовить к работе микроскоп.
6. Микроскопировать под иммерсией.
7. Сделать выводы и записать результаты в тетрадь.
8. Дать устное разъяснение качеству сметаны.

Микрофлора сыра

Сыроделие представляет собой сложные биохимические процессы, основой которых является молочнокислое и пропионовокислое брожение.

Качество сыра зависит от качества молока, в первую очередь, от степени его обсемененности нежелательными микроорганизмами.

Нормальная микрофлора сыров. В созревании сыров принимают участие молочнокислые бактерии (палочки и кокки) и пропионовокислые бактерии. Молочнокислые бактерии неподвижны, спор не образуют, грамположительные (**Гр+**), факультативные анаэробы, по отношению к температуре их делят на две группы: мезофильные и термофильные.

Сыры, в созревании которых принимают участие только молочнокислые бактерии, называют кисломолочными; сыры, в созревании которых принимают участие молочнокислые бактерии и сычужный фермент, называют сычужными. Сыры изготавливают мягкие и твердые. Твердые сыры в свою очередь делят на мелкие и крупные.

Мелкие сыры. В процессе их приготовления участвуют молочнокислые палочки (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*), молочнокислые (*Streptococcus lactis*) и ароматобразующие стрептококки. В мелких сырах появление рисунка («глазков») связано с деятельностью ароматобразующих стрептококков.

Крупные сыры. В процессе их приготовления участвуют молочнокислые и пропионовокислые бактерии. При созревании сыра за молочнокислым брожением наступает пропионовокислое брожение, которое обуславливает появление в сыре «глазков».

В изготовлении сыра Рокфор участвует плесень *Penicillium roqueforti*.

Пороки сыра. Причиной являются посторонние микроорганизмы: бактерии группы кишечной палочки (*Coli aerogenes*), анаэробные маслянокислые бактерии рода клостридиум (*Clostridium*), плесени (*Penicillium*, *Aspergillus*), солеустойчивая осповидная плесень *Oospora*, которая растет в среде при 14-16% поваренной соли. Бактерии вызывают вспучивание сыра за счет образования большого количества газов (CO_2 и H_2), плесени изменяют белковые вещества и жиры сыра, образуют токсины, изъязвляют корку сыра, снижают

его товарный вид. Удаление плесени с поверхности сыра не гарантирует отсутствие токсинов в продукте.

Микробиологический контроль сыра. Контроль качества готовой продукции проводят по следующим микробиологическим показателям: наличию БГКП, содержанию золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*), наличию патогенных микроорганизмов, в том числе сальмонелл. При вспучивании дополнительно определяют общее количество спор мезофильных анаэробных лактозосбраживающих бактерий, проводят микроскопирование мазков сыра. БГКП в зависимости от вида сыра не допускаются в 0,01...0,001 г, *Staphylococcus aureus* – не более 500 КОЕ/г, патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы не допускаются в 25 г сыра.

Лабораторная работа 10.2 (№16) - Исследование сыра и молока, используемого в сыроделии

Цель работы. Ознакомиться с методами исследования сыра и молока, используемого в сыроделии. Изучить приемы определения качественного состава микрофлоры молока по пробе на брожение и сычужно-бродильной пробы. Изучить микрофлору сыра методом отпечатков.

Материалы и оборудование. Образцы сыра (типа голландского), нож, предметные стекла, спиртовка, спички, метиленовый синий, песочные часы, иммерсионное масло, микроскоп.

Контроль сыропригодности молока. Для контроля сыропригодности кроме редуктазной пробы в молоке один раз в декаду определяют общее количество спор мезофильных анаэробных лактатсбраживающих бактерий (маслянокислых бактерий рода *Клостридиум*) и бактерии группы кишечной палочки (БГКП). Споры мезофильных анаэробных лактатсбраживающих бактерий и БГКП не должны обнаруживаться в 0,1 мл молока.

Проба на брожение. Проба на брожение основана на способности некоторых микроорганизмов, присутствующих в молоке, свертывать его. В за-

висимости от времени свертывания и характера образовавшегося сгустка оценивают состав микрофлоры молока и пригодность его для производства сыра.

Методика выполнения. В стерильные пробирки на 30-40 мл наливают молоко, закрывают ватными пробками и ставят в термостат или водяную баню при 38- 40°С. Наблюдение проводят в течение 12-24 ч. Отмечают время свертывания, запах, вкус, кислотность.

Результат. При свертывании через 12 ч молоко считается доброкачественным. Молоко, давшее сгусток со вспучиванием или пузырьками газа в сыроделии не применяется. Окончательную оценку производят через 24 ч и молоко по характеристике сгустка относят к одному из 4 классов (табл. 7).

Таблица 7

Определение качества молока для сыроделия по бродильной пробе

Класс	Качество молока	Характеристика сгустка
1	Хорошее	Наблюдается начало свертывания без выделения сыворотки и пузырьков газа, незначительные полосы на сгустке
2	Удовлетворительное	Сгусток с полосками и пустотами, заполненными сывороткой, структура сгустка малозернистая
3	Плохое	Сгусток с обильным выделением зеленоватой или беловатой сыворотки; сгусток крупнозернистый; наблюдаются пузырьки газа в сгустке или сливочном слое.
4	Очень плохое	Сгусток разорван и пронизан пузырьками газа, вспучен как губка

- *сычужно-бродильная проба.* Сычужно-бродильная проба основана на способности некоторых микроорганизмов и сычужного фермента свертывать молоко. По характеру образовавшегося сгустка оценивают качество молока на его пригодность для производства сыра.

Методика выполнения. В пробирку с 30 мл молока вносят 1 мл сычужной закваски, перемешивают и выдерживают 12 ч при 38-40° С. Доброкачественное молоко свертывается в течение 20 минут, а через 12 ч дает совершенно однородный плотный сгусток с прозрачной сывороткой. Через 12 ч

пробы просматривают и делают заключение о пригодности молока к сыроделию (табл. 8).

Таблица 8

Определение качества молока для сыроделия по сычужно-бродильной пробе

Класс	Качество молока	Характеристика сгустка
1	Хорошее	Сгусток нормальный с гладкой поверхностью, упругий, без глазков на продольном разрезе, плавает в прозрачной сыворотке
2	Удовлетворительное	Сгусток с единичными глазками, мягкий, разорван, но не вспучен - не поднялся кверху.
3	Плохое	Сгусток с многочисленными глазками. Губчатый, мягкий, вспучен, всплыл вверх или вместо сгустка наблюдается хлопьевидная масса

Результат. Молоко 3-го класса не годно для сыроделия, т.к. в нем присутствует газообразующая микрофлора (мезофильные анаэробные лактозосбраживающие бактерии и бактерии группы кишечной палочки).

Изучение микрофлоры сыра методом отпечатков

Методика выполнения. Для исследования берут свежий сыр. Фламбированным ножом в сыре срезают место пробы. Далее срезают тонкий кусочек сыра и сдавливают его между двумя чистыми сухими предметными стеклами. Затем стекла аккуратно разъединяют и удаляют сыр. На стекле получился мазок-отпечаток сыра. Полученный мазок-отпечаток сушат на воздухе, фиксируют спирт-эфиром и окрашивают метиленовым синим. Микроскопируют под иммерсией.

Результат. В крупных сырах выявляются палочковидные формы бактерий (молочнокислые и пропионовокислые), в мелких – молочнокислые стрептококки (*Streptococcus lactis*).

Задание студентам

1. Профламбированным ножом срезать в сыре место пробы.
2. Срезать ножом тонкий кусочек сыра.

3. Двумя чистыми сухими предметными стеклами сдавить тонкий кусочек сыра.
4. Полученный мазок-отпечаток сыра высушить на воздухе, зафиксировать спирт-эфиром.
5. Фиксированный мазок окрасить метиленовым синим.
6. Микроскопировать под иммерсией (100x)
7. Сделать выводы и записать результаты в тетрадь.
8. Дать устное разъяснение о наличии микроорганизмов и их естественном расположении в исследуемом образце.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие группы микроорганизмов вызывают молочнокислое брожение?
2. Дайте определение молочнокислого брожения.
3. Какие группы молочнокислого брожения вы знаете?
4. Что представляет собой гомоферментативное брожение?
5. Что представляет собой гетероферментативное брожение?
6. В чем заключается принципиальное отличие гомоферментативного брожения от гетероферментативного?
7. Формы клеток молочнокислых бактерий.
8. Из каких источников микроорганизмы попадают в сыр?
9. Какую роль выполняют пропионовокислые бактерии при выработке твердых сыров?
10. Какие микроорганизмы являются представителями технически вредной микрофлоры в производстве сыров?
11. Какие микроорганизмы являются возбудителями вспучивания сыров?
12. Назовите объекты микробиологического контроля в производстве сыров.
13. По каким показателям контролируют качество сыров?
14. Какие микроорганизмы используются в производстве сыров?
15. Какую роль в производстве сыров играют молочнокислые бактерии?
17. По каким показателям контролируют качество сыров?

Микрофлора сливочного масла

Сливочное масло вырабатывают из пастеризованных сливок, микрофлору которых составляют термофильные молочнокислые бактерии, споры бактерий. Молочный жир считают самой ценной составной частью молока, он является источником энергии для человека. Важнейшим свойством молочного жира является его приятный вкус, в жире содержатся жирорастворимые витамины А, D, E.

При выработке масла любого вида в него могут попасть бактерии из сливок, с аппаратуры, из воздуха, воды. Скорость развития попавших в масло бактерий зависит от способа получения сливочного масла, так как бактерии могут размножаться только в плазме масла. *Плазма масла* — это водный раствор белков, молочного сахара и солей. Плазма находится в масле в виде капелек разной величины. Плазма кисломолочного масла, выработанного поточным способом, имеет высокую степень дисперсности, поэтому развитие бактерий в таком масле идет медленно. Плазма сладкосливочного масла, выработанного сбивным методом, более доступна бактериям и они развиваются значительно быстрее.

Хранение масла при недостаточно низких температурах изменяет его качество в результате протекания микробиологических процессов. Поэтому для характеристики масла имеет значение общее количество бактерий (КМАФАнМ), в том числе гнилостных, развитие которых приводит к сильной пептонизации и последующему глубокому распаду белка с образованием неприятно пахнущих веществ. В результате возникают пороки масла: нечистый, горький, сырный вкус (привкус Рокфора). Среди микроорганизмов, попавших в масло, может быть и кишечная палочка, наличие которой служит показателем санитарного состояния предприятия.

Микрофлора масла сладкосливочного представлена остаточной микрофлорой пастеризованных сливок и посторонними микроорганизмами (вторичная микрофлора), попавшими в масло в процессе выработки с производ-

ственного оборудования, из воздуха при фасовке, упаковке. К ним относятся мезофильные и психротропные споровые и бесспорные палочковидные бактерии, энтерококки и микрококки, многие из которых расщепляют молочный жир и белки. Количество бактерий в сладкосливочном масле - от тысяч до сотен тысяч в 1 г. В блоке обсемененность верхнего слоя выше, чем в толще.

Хранение сладкосливочного масла при плюсовой температуре способствует увеличению количества микроорганизмов. Чем выше температура хранения масла, тем быстрее увеличивается количество микроорганизмов. Так, при 15° С уже через 5 дней хранения число молочнокислых бактерий в 1 г достигает десятков миллионов. При низкой плюсовой температуре (5° С) бактерии развиваются медленнее и размножаются главным образом не молочнокислые, а посторонние неспорные палочки, микрококки и дрожжи.

Микрофлора кисломасла. Кисломасло изготавливают из пастеризованных сливок, заквашенных чистыми культурами молочнокислых (*S. lactis*, *S. cremori*) и ароматизирующих (*S. lactis*, *S. diacetilactis*, *S. citrovarus*, *S. paracitrovarus*) стрептококков. Количество бактерий в масле кисломаслом достигает миллионов и десятков миллионов в 1 г. Посторонняя микрофлора в кисломасле незначительна, её развитие задерживается молочной кислотой, которую вырабатывают молочнокислые бактерии. При низких положительных температурах хранения масла кисломасла число бактерий снижается, посторонняя микрофлора не развивается из-за повышенной кислотности масла.

Лабораторная работа 10.3 (№ 17) - Микробиологическое исследование сливочного масла

Цель работы. Ознакомиться с методами отбора проб и приемами микробиологического контроля сливочного масла. Определить качественный состав микрофлоры свежего и несвежего масла.

Материалы и оборудование. Пробы масла различной свежести, стерильные банки с притертыми крышками, пробирки со стерильной водой, водяная баня, термостат, центрифуга, стерильные градуированные пипетки, предметные стекла, растворы красок, стерильные пробирки с резиновыми пробками, микроскопы, чашки Петри с МПА, бактериологические петли.

Микробиологические показатели при изучении качества сливочного масла: общее количество бактерий, гнилостные бактерии, кишечная палочка, плесневение.

Отбор проб. Для учета численности микроорганизмов масло берут стерильным щупом из двух...трех мест на расстоянии 3-5 см от края блока. Щуп опускают примерно на $\frac{3}{4}$ его длины. Из щупа шпателем берут 20 г продукта и помещают в стерильные банки с притертыми крышками. При исследовании на плесневые грибы делают соскобы из тех мест, где мицелий виден через лупу или явно.

Микробиологический контроль сливочного масла. Перед исследованием пробу масла в банке расплавляют на водяной бане (температура 40...50° С). Для разведения масла из расплавленного и тщательно перемешанного образца стерильной пипеткой берут 1 мл масла и вносят в пробирку с 9 мл стерильной воды, подогретой до 40° С. Из полученного разведения 1:10 (10^{-1}) готовят последующие разведения (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). Из разведений делают посев на питательные среды. Для определения в масле общего количества микробов используют метод посева на МПА; для учета бродильного титра – на среду Кесслера. Количество бактерий, вырабатывающих протеолитические ферменты, определяют методом посева на молочный агар, дрожжей и плесневых грибов - на сусло-агар. Для приготовления мазков масло нагревают в центрифужных пробирках на водяной бане при 70° С и центрифугируют 10 мин при частоте вращения 1500 об/мин. Верхний слой масла и белки сливают, из осадка готовят мазки. Мазки фиксируют смесью спирта и эфира,

окрашивают раствором метиленового синего и микроскопируют с использованием иммерсионного объектива.

Результат. Качество сливочного масла определяют по микробиологическим показателям - общее количество бактерий, гнилостные бактерии, кишечная палочка, плесневые грибы, дрожжи. В мазках из свежеприготовленного масла обнаруживаются молочнокислые стрептококки, в мазках из несвежего масла наряду с молочнокислыми бактериями отмечается большое количество дрожжей и плесневых грибов.

Задание студентам

1. Пробы свежего и несвежего масла массой 15 г поместить в центрифужные пробирки.
2. Центрифужные пробирки с пробами поместить в водяную баню при 70° С.
3. Центрифугировать 10 мин при 1500 об/мин.
4. Верхний слой слить, из осадка сделать мазок на предметном стекле.
5. Мазок зафиксировать смесью спирта с эфиром.
6. Фиксированный мазок окрасить метиленовым синим 2...3 мин.
7. Микроскопировать под иммерсией (100х).
8. Сделать выводы о качестве масла, результаты записать в тетрадь.
9. По полученным результатам сделать устное объяснение.

Вопросы для самоконтроля

1. Что является самым ценным для человека в молоке?
2. Почему в кисломолочном масле микроорганизмы развиваются медленно, а в сладкомолочном масле - интенсивнее?
3. Какие микроорганизмы относятся к нормальной микрофлоре кисломолочного и сладкомолочного масла?
4. Какие микроорганизмы развиваются в кисломолочном и сладкомолочном масле при хранении?
5. Перечислите методы микробиологического контроля сливочного масла.

6. Как подготовить мазки масла к микроскопированию?
7. Назовите источники поступления микроорганизмов в масло.
8. Какие виды микроорганизмов вводят в состав закваски для кисломолочного масла?
9. По каким показателям определяют качество масла?

Занятие 11. Микробиология мяса

Цель занятия. Ознакомление с микрофлорой мяса, путями его обсеменения и микробиологическими показателями его качества.

Общие сведения. Мясо — один из важнейших продуктов питания, высокоценный пищевой продукт, источник полноценных животных белков, содержащих все незаменимые аминокислоты в значительных количествах и в наиболее благоприятных соотношениях. Мясо – это скелетная мускулатура убойных и съедобных диких животных. Мясом также называют туши и их части.

Мясо является хорошим питательным субстратом для многих микроорганизмов. В мясе содержатся все основные компоненты, необходимые для их развития: белки, жиры и углеводы. Развитию микроорганизмов благоприятствуют рН мяса и содержание доступной воды (a_w). Поэтому мясо быстро подвергается порче.

В мясе здоровых хорошо отдохнувших перед убоем животных микроорганизмы обычно отсутствуют. Существует два пути обсеменения мяса микроорганизмами: эндогенный и экзогенный. При *эндогенном* пути обсеменения микроорганизмы, населяющие организм животного, заносятся в мускулатуру с током крови. При *экзогенном* (послеубойном) обсеменении микроорганизмы попадают на мясо из внешней среды. Они попадают на поверхность туши со шкуры животного, с инструментов, рук, одежды рабочих, из воздуха и т.д., постепенно проникают вглубь мяса по соединительнотканым

прослойкам до надкостницы вследствие рыхлой структуры этой ткани, распространяются вдоль нее в окружающих надкостницу тканях.

Предохранение мяса от действия микробов обеспечивается соблюдением ряда условий: достаточный отдых животных перед убоем, очистка шкуры и копыт перед убоем, хорошее обескровливание, правильный туалет туши, быстрое охлаждение, поддержание $T=0^{\circ}\text{C}$ и влажности воздуха 85%. Но на практике следует исходить из того, что в мясе убитых животных всегда имеются микроорганизмы, особенно большое их количество обнаруживается во внутренних органах и тканях утомленных и больных животных.

После убоя скота происходят изменения в мышечной ткани. Созревание мяса характеризуется сложными физико-химическими процессами, возникающими под влиянием ферментов. При распаде гликогена в мышечной ткани накапливается молочная кислота, препятствующая развитию микрофлоры.

Мясо созревает несколько дней. Если в этот период мясо хранить при температурах, благоприятных для развития микроорганизмов, в нем начнутся микробиологические процессы. Особую роль играют бактерии, большая часть которых способна разлагать белок, т. е. осуществлять процесс гниения мяса. Преобладающей микрофлорой в гниющем мясе становятся гнилостные грамотрицательные палочковидные формы микроорганизмов.

Лабораторная работа 11.1 (№ 18) – Определение качества мяса с использованием микробиологических показателей

Цель работы. Ознакомиться с методами определения качества мяса по общей численности микроорганизмов и наличию БГКП. Определить свежесть мяса методом бактериоскопии и методом посева для выявления анаэробов.

Материалы и оборудование. Пробы мясного сырья, стерильная посуда, инструменты, стерильные питательные среды, красители, раствор Люголя, фильтровальная бумага, дистиллированная вода, горелка, дезинфицирующие средства.

Качество и стойкость мяса при хранении связаны с содержанием микроорганизмов на его поверхности. Качество мяса определяют микробиологическими показателями (КМАФАнМ, БГКП), методом бактериоскопии и выявления анаэробов методом посева.

Задание 1. Определение в мясе КМАФАнМ

Взятие проб. Для определения в мясе общей численности микроорганизмов (КМАФАнМ) с поверхности образца мяса и из глубинных слоев отбирают пробы, которые измельчают стерильными ножницами и готовят суспензию.

Методика выполнения. Из измельченной пробы навеску в 10 г помещают в колбу со 100 мл стерильной воды и встряхивают круговыми движениями 1-2 мин, дают отстояться. Из полученной суспензии готовят десятикратные разведения. Из каждого разведения одновременно высевают по 1 мл в чашки Петри и заливают мясо-пептонным агаром (МПА). Посевы помещают в термостат и инкубируют при 30° С в течение 72 ч в аэробных условиях.

Результат. После инкубирования посевов подсчитывают количество колоний на тех чашках Петри, где выросло от 15 до 300 колоний. Результаты записывают в таблицу 9, сравнивают показатели с требованиями СанПиН и делают выводы о качестве мяса.

Задание 2. Определение в мясе наличия БГКП

Методика выполнения. Для определения БГКП стерильной пипеткой берут по 1 мл исходной суспензии каждого разведения и вносят в жидкую селективную среду Кесслера. Посевы помещают в термостат и инкубируют при 36° С в течение 24 часов. Положительными считают те посевы, в которых отмечается интенсивный рост микроорганизмов, проявляющийся помут-

нением среды, образованием газа, изменением цвета среды в кислую сторону. Для подтверждения принадлежности микроорганизмов, выросших на среде Кесслера, к колиформным бактериям, делают пересевы на среду Эндо. Посевы помещают в термостат и инкубируют при 36° С в течение 24 часов.

Результат. На среде Эндо бактерии группы кишечной палочки образуют колонии розового или ярко-красного цвета часто с металлическим блеском. Записывают в таблицу 9.

Таблица 9 - Результаты микробиологического исследования мяса

Вид продукта	КМАФАнМ КОЕ/г, не более		Масса продукта (г), в которой не допускаются БГКП		Вывод
	норматив	результат	норматив	результат	
Мясо свежее	$1 \cdot 10$		1		
Мясо замороженное	$1 \cdot 10^3$		0,01		
Полуфабрикаты натуральные	$5 \cdot 10^5$		0,001		
Мясной фарш	$5 \cdot 10^6$		0,0001		

Задание 3. Определение свежести мяса методом бактериоскопии

Методика выполнения. Для анализа берут мясо свежее и несвежее. Чистое предметное стекло протирают спиртом (для обезжиривания), обжигают на пламени горелки (для стерилизации), слегка остужают. На предметных стеклах делают по два мазка-отпечатка с каждого образца – один с поверхностного, другой с глубинного слоя каждого сорта мяса. Для приготовления препарата-отпечатка с поверхностного слоя стерильными ножницами вырезают кусочек мяса (0,5 - 1 г) и срезанной стороной плотно прикладывают к поверхности обожженного предметного стекла. Для приготовления мазка-отпечатка из глубинного слоя поверхность мяса прижигают нагретым шпателем, стерильным ножом делают надрез и из глубины кусочка стерильными ножницами вырезают небольшой кусочек мяса (0,5 - 1 г) и прикладывают к поверхности обожженного предметного стекла. Полученные мазки-

отпечатки сушат на воздухе, фиксируют. Для этого проводят мазок в пламени горелки 2 - 3 раза тыльной стороной стекла. Фиксированные мазки окрашивают по Граму, микроскопируют под иммерсией, отмечая количество и форму клеток.

Результаты.

Препарат-отпечаток свежего мяса окрашивается плохо. В мазке-отпечатке с поверхностного слоя встречаются единичные палочки и кокки. В препарате из глубоких слоев микроорганизмы или отсутствуют или встречаются не во всех полях зрения.

Препарат-отпечаток мяса сомнительной свежести окрашивается удовлетворительно. При просмотре под микроскопом в каждом поле зрения обнаруживаются десятки микробов, особенно много их в препарате из поверхностного слоя.

Препарат-отпечаток мяса, непригодного в пищу, окрашивается хорошо. При просмотре препаратов как с поверхностного так и глубокого слоев в каждом поле зрения встречаются по 30 и более микробов с преобладанием палочек. При разложении мяса кокки в мазках-отпечатках практически отсутствуют, все поле зрения усеяно палочками. Среди гнилостных микроорганизмов в мясе преобладают микрококки, кишечная палочка, флюоресцирующие бактерии, споровые формы.

После изучения препаратов-отпечатков результаты заносят в таблицу № 10, делают микробиологическую оценку мяса. Вывод записывают в тетрадь.

Из аэробов сильно-действующими гнилостными микроорганизмами являются *Бациллюс субтилис*, *Бациллюс микоидес*.

Микробиологическая оценка мяса

Качество мяса	Количество клеток микроорганизмов в поле зрения	Результаты исследования		Выводы
		Гр+ клетки, %	Гр- клетки, %	
Свежее	Единичные клетки			
Сомнительной свежести	Десятки клеток			
Несвежее	Все поле зрения занято клетками			

Задание 4. Выявление в мясе анаэробов методом посева

Методика выполнения. Для выявления анаэробов поверхность образцов свежего и несвежего мяса прижигают нагретым шпателем, стерильным ножом делают надрез и из глубины отбирают небольшую пробу. Соблюдая стерильность, опускают пробу мяса в пробирку с расплавленным и предварительно охлажденным до 50° С МПА. Вращают пробирку между ладонями, чтобы кусочек мяса опустился на дно пробирки. Пробирки с МПА и кусочками свежего и несвежего мяса помещают в термостат при 40° С для инкубации. Посевы в течение нескольких дней просматривают в термостате.

Результат. Если мясо несвежее, на МПА развиваются газообразующие анаэробные формы и в пробирках видны разрывы агар-агара из-за образования микроорганизмами газа.

В пробирках со свежим мясом столбик МПА плотный, без разрывов и трещин, так как газообразующие формы анаэробов в нем не развиваются.

Из факультативных анаэробов сильно действующими гнилостными микроорганизмами являются *Proteus vulgaris*, *Clostridium putrificus*, *Clostridium sporogenes*, которые часто вызывают порчу пищевых продуктов.

Вопросы для самоконтроля

1. Дайте характеристику мяса как продукта питания человека.
2. Дайте характеристику мяса как ценного субстрата для микроорганизмов.

3. Какие основные группы микроорганизмов встречаются в мясе?
4. Эндогенный и экзогенный пути обсеменения мяса.
5. С чем связана стойкость мяса при хранении?
6. Как определяется обсемененность мяса?
7. Что такое бактериоскопический метод определения свежести мяса?
8. Какие микробиологические показатели являются критерием для определения качества мяса?
9. Какие питательные среды необходимы для определения бактерий группы кишечной палочки?

Занятие 12. Микробиология рыбы и рыбопродуктов

Цель занятия. Ознакомление с микрофлорой рыбы и рыбопродуктов, микробиологическими показателями их качества.

Общие сведения. Рыба является важным продуктом питания. Мясо рыбы содержит полноценные белки, легкоусвояемые биологически активные жиры, минеральные вещества, экстрактивные вещества, жиро- и водорастворимые витамины А, Д, группы В и др. Доля воды в рыбе составляет 52-85 % массы рыбы. Мясо рыбы по химическому составу близко к мясу млекопитающих. Несмотря на сходство в химическом составе с мясом, рыба и рыбные продукты в большей степени, чем мясо, подвержены воздействию микробов. Объясняется это более высокой степенью обсеменения рыбы, спецификой холодолюбивой микрофлоры.

Свежая рыба. Свежевыловленная рыба в значительной степени обсеменена микроорганизмами. Их количество на поверхности рыбы колеблется в пределах $10^2 \dots 10^7$ клеток на 1 см^2 . Состав поверхностной микрофлоры кожных покровов рыб близок к микрофлоре воды. В теплое время года она представлена мезофильной микрофлорой (разные виды микрококков, коринебактерии), которая обладают протеолитическими, жирорасщепляющими и

кислотообразующими свойствами. Особенно богаты микроорганизмами жабры. Источником обсеменения мяса рыбы является кишечник, где количество микроорганизмов в 1 г достигает 10^8 клеток. В кишечнике свежей рыбы *постоянно* обнаруживаются представители родов псевдомонас, ахромобактер, микрококкус, аэромонас, *часто* - спорообразующие анаэробные микроорганизмы (кlostридиум спорогенез, кlostридиум перфрингенс и др.), *реже* - мицелиальные грибы, дрожжи, эшерихии коли. Особо важное значение имеет выделение из рыбы патогенных для человека микроорганизмов. К ним относятся бактерии родов сальмонелла, шигелла, листерия, золотистый стафилококк, кlostридиум ботулинум, галофильный вибрион (*V. parahaemolyticus* – возбудитель отравления).

Снулая рыба начинает быстро портиться. Основная причина порчи - расщепление микроорганизмами белковых и экстрактивных веществ, гидролиз и окисление жира. Чем выше обсемененность рыбы, тем быстрее снижается её качество.

Переработка рыбы. После отлова рыба подвергается переработке. Промывка удаляет слизь, в которой находятся бактерии, обсемененность уменьшается на 80 – 90 %. Разделка и потрошение рыбы приводят к уменьшению количества микроорганизмов. После филетирования общая бактериальная обсемененность рыбного сырья не должна превышать $5 \cdot 10^4$ клеток в 1 г. На этом этапе изменяется качественный состав микрофлоры филе, так как из воздуха, рук обработчиков, с оборудования в рыбу попадают споровые аэробы, увеличивается количество мезофильных микроорганизмов.

Охлажденная рыба. При охлаждении увеличения численности микрофлоры рыбы не происходит, срок её хранения увеличивается. Число мезофильных микроорганизмов уменьшается, психрофильных (*ахромобактер, псевдомонас, флавобактериум*) - возрастает. В течение 10 суток число психрофильных (*холодолюбивых*) бактерий составляет 50% всей микрофлоры, через 18 суток – 96%. Быстрее размножаются псевдомонады, которые изме-

няют качество рыбы за счет высокой активности по отношению к белкам и жиру. Первые признаки изменения качества рыбы, вызываемых псевдомонадами, наблюдаются при их количестве $10^6 - 10^7$ клеток на 1 см^2 поверхности. В связи с этим, срок хранения рыбы на предприятиях общественного питания в холодильных камерах при температурах от 0 до 2°C составляет 48 ч.

Рыба мороженная. В процессе замораживания (до -12°C и ниже) многие микроорганизмы, находящиеся в рыбе, погибают. Обсемененность рыбы после замораживания колеблется в пределах $10^2 - 10^3$ в 1 г. **Важно:** чем выше обсемененность рыбы до замораживания, тем больше микроорганизмов сохраняется на мороженой рыбе. Психрофильные бактерии родов псевдомонас, ахромобактер менее стойки к низким температурам, чем бактерии рода флавобактериум. Низкие температуры приводят к гибели микроорганизмов, но эндоферменты, освобождающиеся после автолиза бактериальных клеток, принимают участие в гидролитических и окислительных процессах жира, сохраняют активность в замороженной рыбе длительное время.

На замороженной рыбе обнаруживают микрококки, палочковидные, не образующие спор бактерии, в небольшом количестве встречаются споры плесеней. Патогенные микроорганизмы (сальмонеллы, листерии), попадающие на рыбу, при замораживании сохраняются.

Оттаявшая рыба быстро портится, так как размораживание (особенно медленное) способствует гибели некоторых микробов, но сохранившиеся микроорганизмы начинают быстро размножаться.

Количество микробов $8 \cdot 10^5$ КОЕ/г мышечной ткани рассматривается как граница пригодности рыбы для питания. При использовании рыбы, подвергшейся бактериальному разложению, возможны неспецифические отравления от образовавшегося в ней рыбного яда.

Для увеличения сроков годности рыбы ее коптят горячим и холодным копчением.

Горячее копчение (85-95° С) гарантирует гибель психрофильных и мезофильных микроорганизмов, в том числе патогенных. Сохранить жизнеспособность могут только споры и отдельные грамположительные бактерии.

Холодное копчение (18-26° С) предварительно посоленной рыбы гарантирует уменьшение числа клеток родов флавобактериум и псевдомонас, имеющих основное значение в процессах порчи рыбы.

Качество рыбы определяют выявлением КМАФАнМ, БГКП, количества клеток стафилококка золотистого (*Staphylococcus aureus*).

Лабораторная работа 12.1 (№ 19) - Микробиологическое исследование рыбы

Цель работы. Определить качество образцов рыбы по общей численности микроорганизмов.

Материалы и оборудование. Стерильная посуда, питательные среды для посева, образцы рыбы (свежая, охлажденная, мороженая, горячего или холодного копчения), водяная баня, инструменты, предметные стекла, спирт-эфир, спиртовка, спички, микроскоп, термостат, масло иммерсионное, фильтровальная бумага.

Отбор проб и методика выполнения. Отбирают не менее трех проб мелкой рыбы. От каждого экземпляра из нескольких мест вырезают кусочки с кожей и мышцами, не затрагивая кишечник, площадью 4 см², толщиной 4-5 мм и помещают в стерильную емкость.

Пробы от мороженой целой рыбы отбирают по 2-3 кусочка, дефростируют перед приготовлением навески при температуре 2 – 5° С. Навеску делают сразу после дефростации. Общая масса отобранной пробы должна быть около 300 г. Пробы измельчают или растирают, отвешивают навеску 10 г для получения десятикратных разведений.

Пробы копченой рыбы отбирают общей массой 500 г. Из крупной рыбы нарезают поперечные куски массой не более 300 г. Рыбу горячего копчения измельчают вместе с кожей, холодного – без кожи, в обоих случаях не

затрагивая кишечник. Кожу перед снятием обрабатывают 70%-ным спиртом. Для анализа берут навеску 10 г. Методика определения КМАФАнМ описана в предыдущих разделах.

Задание студентам

1. Определить микробиологические показатели рыбы свежей, охлажденной, замороженной, горячего и холодного копчения. Сделать посеvy.
2. На следующем занятии подсчитать выросшие колонии, пересчитать КМАФАнМ на 1 г продукта.
3. Результаты занести в таблицу 11.
4. Сравнить полученные результаты с нормативными показателями и сделать выводы о качестве продукта.

Таблица 11 - Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в образцах рыбы

Вид продукта	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более		Вывод
	норматив	результат	
Рыба свежая	$5 \cdot 10^4$		
Рыба охлажденная, мороженая	$1 \cdot 10^5$		
Рыба горячего копчения	$1 \cdot 10^4$		
Рыба холодного копчения	$1 \cdot 10^4$		

Вопросы для самоконтроля

1. От чего зависит микрофлора свежевывловленной рыбы?
2. На каких участках тела рыбы обнаруживается наибольшее количество микроорганизмов?
3. Может ли рыба быть источником инфекции для человека?
4. Как микроорганизмы попадают в мышцы рыбы?
5. Какое количество микробов в мышцах рыб является границей пригодности рыбы для питания?
6. Что представляет собой рыбный яд?

Занятие 13. Микробиология яиц и яйцепродуктов

Цель занятия. Ознакомиться с микробиологическими методами исследования яиц и яичных продуктов.

Общие сведения. Яйцо сельскохозяйственной птицы – один из важнейших продуктов питания, высокоценный пищевой продукт, источник полноценных животных белков, содержащих все незаменимые аминокислоты в значительных количествах и в наиболее благоприятных соотношениях. Яйцо – природный продукт, производимый птицей. В нем содержатся все необходимые для новой жизни питательные и биологически активные вещества.

Содержимое свежеснесенного яйца, полученного от здоровой курицы, стерильно, т.е. оно не содержит микроорганизмов. Это объясняется активно протекающей фагоцитарной реакцией в яйцеводах здоровых птиц, бактерицидными свойствами скорлупы и яичного белка, содержащими антибиотическое вещество - *лизоцим*. Поэтому, несмотря на наличие пор в скорлупе, стерильность яиц может сохраняться несколько месяцев.

В то же время яйцо является опасным в эпидемиологическом отношении продуктом. Инфицирование яиц микроорганизмами может происходить *эндогенным и экзогенным путями*. При эндогенном заражении микроорганизмы проникают в яйцо в процессе его формирования в яичнике или в яйцеводе больной птицы. Это могут быть вирусы, бактерии, грибы, возбудители туберкулеза, сальмонеллеза. Экзогенное обсеменение яиц связано с попаданием микроорганизмов на скорлупу с пометом, с пером, из почвы, из подстилки.

Важно знать! Особенно опасны яйца водоплавающей птицы, инфицированные сальмонеллами. Поэтому продавать гусиные и утиные яйца в розничной торговле запрещено.

Чистота скорлупы – важный показатель качества пищевых яиц. Загрязненная скорлупа портит товарный вид яиц и резко сокращает сроки их хранения. На 1 см² поверхности свежих чистых яиц находятся десятки, сотни, реже

– тысячи бактерий, на загрязненных – от десятков тысяч до миллионов микробных клеток. Во время сбора, хранения, транспортировки в яйца через скорлупу могут попадать из внешней среды сапрофитные и патогенные микроорганизмы. Обсеменение яиц увеличивается при антисанитарном состоянии гнезд, тары для хранения и транспортировки, при повышенной влажности воздуха, так как влажная скорлупа наиболее проницаема для микроорганизмов.

Яйца относятся к скоропортящимся продуктам. Для их хранения необходимо создавать условия, которые обеспечивают замедление протекающих в яйце физико-химических процессов и предупреждают проникновение микроорганизмов. При длительном хранении и попадании внутрь яйца псевдомонад, стафилококков, аэробных гнилостных бактерий, дрожжей и плесеней, протей, эшерихий коли, анаэробных клостридий качество яиц изменяется под действием протекающих в них окислительных, аутолитических и микробиологических процессов. Под действием ферментов, выделяемых микроорганизмами, составные части яйца разлагаются с образованием специфических продуктов распада.

В пищу используют свежие куриные яйца, хранящиеся в холодильнике. Из яиц получают яичные продукты – **меланж** (*замороженная смесь белка и желтка*) и яичный порошок. При изготовлении меланжа яйца необходимо дезинфицировать, так как скорлупа является основным источником бактериальной обсемененности меланжа. Меланж скоропортящийся продукт. Размороженный меланж быстро портится из-за размножения в нем микроорганизмов. В готовом меланже обнаруживают большое количество микроорганизмов. Для снижения микробной обсемененности меланж пастеризуют 1-3 мин при низкой температуре (60°C), что снижает обсемененность яичной смеси на 95-99%. Согласно правилам СанПиН в меланже допускается мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) не более $5 \cdot 10^5$, не допускаются БГКП в 0,1 г, золотистого стафилококка и протей – в 1 г, сальмонеллы - в 25 г.

При изготовлении **яичного порошка** высушиванием погибают не все микроорганизмы. Это зависит от степени обсеменения яичной массы перед высушиванием и санитарных условий производства. Количество бактерий в порошке может колебаться от десятков до сотен тысяч микробов в 1 г. Преобладают спорообразующие и кокковые формы бактерий. При правильном хранении (*соблюдение температурного и влажностного режимов воздуха, вид тары*) микробы размножаться в порошке не могут, так как он имеет влажность 3-8%, но долго сохраняют свою жизнеспособность. Среди них бывают сальмонеллы, которые сохраняются в яичном порошке 4 – 9 мес. Качество *яичного порошка* оценивают по микробиологическим показателям как и меланжа (КМАФАнМ, БГКП, золотистый стафилококк, протей, сальмонеллы).

Лабораторная работа 13.1 (№ 20) - Микробиологическое исследование яиц и яйцепродуктов

Цель работы. Ознакомиться с методами микробиологического исследования яиц и яичных продуктов. Провести определение КМАФАнМ и плесневых грибов в замороженном меланже (смеси белка и желтка) методом посева на МПА в чашки Петри.

Материалы и оборудование. Стерильная посуда, питательные среды для посева, образцы яиц и яйцепродуктов, стерильная вода, инструменты, предметные стекла, спирт-эфир, спиртовка, спички, микроскоп, термостат, масло иммерсионное, фильтровальная бумага.

Методика выполнения. Для исследования яиц скорлупу протирают стерильной водой и обжигают горящим тампоном. Пробивают скорлупу и отбирают содержимое яйца пипеткой. Разведения и посев производят аналогично замороженному меланжу. Для исследования замороженного меланжа его размораживают на водяной бане при 45° С, крышку банки протирают спиртовым тампоном, обжигают и вскрывают. На глубине 5 - 10 см стерильно отбирают пробу массой 20 - 25 г и помещают в стерильную пробирку и тща-

тельно перемешивают. Затем навеску в 1 мл вносят в пробирку с 9 мл стерильной воды, перемешивают и из разведения 1:10 отбирают 1 мл для следующего разведения - 1:100. Общую бактериальную обсемененность меланжа определяют чашечным методом путем посева 1 мл из разведений продукта 1:10, 1:100. Посевную жидкость заливают расплавленным (45° С) МПА, перемешивают осторожными вращательными движениями и помещают на 24 ч в термостат при 37° С. Через сутки подсчитывают выросшие колонии. Производят подсчет общего количества микроорганизмов в 1 мл продукта. Готовят фиксированные препараты, окрашивают и микроскопируют под иммерсией.

Результат. Согласно правилам СанПиН в 1 г меланжа допускается мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) не более $5 \cdot 10^5$, в 1 г яйца куриного диетического и столового соответственно $5 \cdot 10^3$ и $5 \cdot 10^5$. Полученные результаты занести в таблицу 12, сделать заключение о качестве продукта.

Таблица 12

Бактериальная обсемененность яиц и меланжа

Вид продукта	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более		Вывод
	норматив	результат	
Яйцо куриное диетическое	$5 \cdot 10^3$		
Яйцо куриное столовое	$5 \cdot 10^5$		
Меланж яичный мороженый	$5 \cdot 10^5$		

Задание студентам

1. Определить общее количество микроорганизмов на поверхности яиц методом посева в чашки Петри на МПА.
2. Получить смыв с поверхности яйца и сделать разведения 1:10 и 1:100.
3. По 1 мл разведения смыва высеять одновременно в две стерильные чашки Петри.
4. Чашки Петри с жидкостью залить подогретым до 45° С МПА и поместить в термостат при 37° С на 24 ч.

5. На следующем занятии подсчитать выросшие колонии, пересчитать на 1 мл продукта.
6. Сравнить полученные результаты с нормативными показателями таблицы 12, сделать заключение.

Вопросы для самоконтроля

1. Объясните роль куриных яиц в питании человека.
2. Как скорлупа защищает содержимое яйца от микроорганизмов?
3. Источником каких инфекций человека могут быть куриные яйца?
4. Пути попадания микроорганизмов в яйцо.
5. Какие опасности хранят в себе куриные яйца и яйцепродукты?

Занятие 14. Микробиология муки и хлеба

Цель занятия. Ознакомление с микробиологическими показателями муки, видами порчи муки, болезнями хлеба, методами определения функциональной активности пекарских дрожжей

Общие сведения. Мука – это порошкообразный продукт, полученный при измельчении зерен пшеницы, ячменя, ржи и др. зерновых. При размоле зерна в муку попадают все микроорганизмы, находящиеся на поверхности зерна. В результате их жизнедеятельности мука при хранении может подвергаться микробиологической порче. Питательные вещества муки более доступны микроорганизмам. В 1 г муки содержатся сотни тысяч бактерий, дрожжей и микроскопических грибов. Некоторые микроорганизмы вызывают болезни зерна, которые, в свою очередь, могут вызвать заболевание человека и животных. Существует допустимая норма (0,05%) содержания в муке вредных грибковых паразитов (спорыньи, головни), выше которой мука уже не может быть использована в пищевых целях. При правильном хранении муки (относительная влажность воздуха не более 70%) развитие микроорганизмов предотвращается низким содержанием в муке влаги. При повышении относи-

тельной влажности воздуха повышается влажность муки и микроорганизмы, которые находились в неактивном состоянии, начинают развиваться. В первую очередь развиваются плесени.

Плесневение – наиболее распространенный вид порчи муки. На ней развиваются *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*. Заплесневелый хлеб в пищу непригоден, так как содержит микотоксины, сохраняющиеся в хлебе. В хлебе, пораженном грибами *Aspergillus*, обнаружены афлатоксины.

Прокисание – наблюдается при увлажнении муки в результате развития в ней кислотообразующих бактерий. Мука приобретает кислый вкус и запах за счет накопления в ней кислот (молочной, уксусной и др.).

Прогоркание – обусловлено окислением липидов муки кислородом воздуха при участии фермента липоксигеназы; порок может быть микробной природы.

Для предохранения муки от микробной порчи необходимо строгое соблюдение регламентированных условий хранения муки (относительная влажность воздуха и температура воздуха).

На хлебозаводах муку исследуют микробиологическим методом для определения степени обсеменения её спорами *Bacillus subtilis* – возбудителя *тягучей картофельной болезни хлеба*. Это спорообразующие аэробные бактерии (картофельная и сенная палочки), которые в настоящее время объединены в один вид – *Bacillus subtilis*. Споры этих бактерий термоустойчивы, всегда присутствуют в муке. При влажности муки более 20% происходит её самосогревание, что сопровождается размножением спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis*, вызывающих картофельную тягучую болезнь хлеба. Во время выпечки споры не погибают и при неправильном хранении готового хлеба прорастают. Вегетативные клетки *Bacillus subtilis* вызывают гидролиз крахмала с образованием большого количества декстринов. Сначала хлеб приобретает фруктовый запах, затем мякиш ослизняется, темнеет, становится

липким, тянется нитями. Такой хлеб в пищу непригоден, изымается из торговых залов и подлежит уничтожению.

Пьяный хлеб – это вид микробиологической порчи вызывается микроскопическим грибом рода *Fuzarium*. Грибы выделяют токсины, которые не разрушаются при выпечке. Хлеб вызывает острое отравление, симптомы которого напоминают отравление алкоголем. Внешних признаков порчи хлеб не имеет.

Хранят муку при температуре не выше 18° С и относительной влажности воздуха 60% в течение 6 мес. При низких температурах (около 0° С) срок хранения муки продлевается до 2 лет.

Лабораторная работа 14.1 (№ 21) – Определение качества муки по микробиологическим показателям

Цель работы. Изучить степень обсемененности муки картофельной палочкой, определить качество муки

Материалы и оборудование. Стерильные пробирки, чашки Петри, пипетки на 1 и 2 мл, жидкая агаризованная питательная среда, образцы муки, вода стерильная дистиллированная, инструменты, предметные стекла, спирт-эфир, спиртовка, спички, микроскоп, термостат, масло иммерсионное, фильтровальная бумага.

Методика выполнения. Отобрать пробы муки и сделать навеску 1 г. Навеску смешать с 9 мл стерильной дистиллированной воды. Из полученного разведения сделать десятикратные разведения 1:100. Провести посев по 1 мл суспензии 1:100 в две чашки Петри. Через 1-2 мин в чашки налить питательную среду, охлажденную до 45° С, в объеме 15 - 20 мл. Осторожными покачиваниями чашки смешать суспензию с питательной средой. Засеянные чашки Петри прогревают при 80° С 20 мин (при 100° С - 5 мин) для уничтожения неспоровой микрофлоры. Затем чашки Петри с посевами поместить в термостат для инкубирования при температуре 37° С на 48 ч.

Результат. На поверхности питательной среды обнаруживается рост отдельных колоний картофельной палочки. Для оценки качества муки подсчитывают количество выросших колоний при посеве 1 мл разведения муки 1:100 и определяют количество спор в 1 г муки. Для этого число подсчитанных колоний умножают на разведение – 100.

Качество муки считается

- хорошим, если в 1 г муки обнаруживается до 200 спор;
- сомнительным, если в 1 г муки обнаруживается от 200 до 1000 спор;
- плохим, если в 1 г муки обнаруживается более 1000 спор.

Например, на МПА выросло 17 колоний. Следовательно, в 1 г муки будет $17 \times 100 = 1700$ спор картофельной палочки. Заключение: мука плохого качества, к употреблению не пригодна.

Лабораторная работа 14.2 (№ 22) – Изучение функциональной активности пекарских дрожжей по их подъемной силе

Цель занятия. Определение подъемной силы дрожжей по методу Островского.

Материалы и оборудование. Дрожжи пекарские, стерильная посуда, стерильная вода, стеклянные палочки, пипетки, чашки Петри, мерный цилиндр на 100 мл, химический стакан на 200 мл, термостат.

Методика выполнения. Навеску прессованных дрожжей 2-3 г помещают в мерный цилиндр, наливают немного воды и размешивают дрожжи стеклянной палочкой. В цилиндр добавляют воды комнатной температуры до объема 100 мл, размешивают содержимое. Пипеткой отбирают 5 мл суспензии дрожжей, переносят в чашку Петри и добавляют 8 г пшеничной муки. Шпателем замешивают шарик теста, опускают его в стакан с 200 мл воды и помещают стакан с шариком в термостат при температуре 30° С. Отмечают продолжительность времени от момента погружения шарика до его всплытия, которая характеризует подъемную силу дрожжей.

Результат. Хорошие дрожжи имеют подъемную силу от 10 до 20 мин.

Вопросы для самоконтроля

1. Назовите основные микроорганизмы муки.
2. При каких условиях в муке начинается развитие микроорганизмов?
3. Чем опасна микрофлора муки для человека?
4. Какие болезни хлеба вы знаете, их характеристика?
5. Назовите возбудителя тягучей картофельной болезни хлеба.
6. Откуда произошло название «пьяный хлеб»? Назовите возбудителя.
7. Чем опасен плесневелый хлеб?
8. Экспресс-метод для определения подъемной силы пекарских дрожжей на хлебозаводах.
9. Какие пекарские дрожжи считаются хорошими?

Занятие 15. Микробиология свежих плодов и овощей

Цель занятия. Ознакомление с эпифитной и патогенной микрофлорой плодов и овощей, микробиологическими методами определения возбудителей заболевания плодов и овощей.

Общие сведения. Свежие плоды и овощи играют важную роль в питании человека. Они содержат легкоусвояемые сахара, органические кислоты, минеральные соли, витамины, пектины, пищевые волокна, способствуют лучшему усвоению пищи.

На поверхности плодов и овощей постоянно обитают различные виды микроорганизмов. На неповрежденной кожице плодов и овощей мало питательных веществ, поэтому только немногие микроорганизмы способны здесь существовать и размножаться. Их называют *эпифитной микрофлорой*. Представителями эпифитной микрофлоры являются молочнокислые, уксуснокислые, различные спороносные бактерии, споры грибов, дрожжи. Количество микроорганизмов на 1 см² поверхности здоровых плодов и овощей колеблется от десятков до сотен тысяч. Овощи обсеменены больше, чем плоды. Бо-

лезни плодов и овощей («гнили») вызывают плесневые грибы, реже дрожжи и бактерии.

Из плесневых грибов порчу плодов и овощей вызывают грибы рода *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Fuzarium*. Некоторые из них продуцируют микотоксины. Дрожжи представлены видами родов *Saccharomyces* (сахаромицес), *Schizosaccharomyces* (шизосахаромицес), *Candida* (кандида), *Torulopsis* (торулопсис), *Cryptococcus* (криптококкус) и др. Среди поверхностной микрофлоры плодов и овощей встречаются и патогенные для человека микроорганизмы: возбудители дизентерии, брюшного тифа, сальмонеллеза. Наиболее распространенные признаки заболевания плодов и овощей - пятнистость, наросты, гниль, налет, язвы.

Лабораторная работа 15.1 (№ 23) – Изучить микрофлору пораженных плодов и овощей

Цель работы. Научиться определять степень поражения плодов и овощей микроорганизмами, освоить методы выявления возбудителя заболевания.

Материалы и оборудование. Плоды и овощи, тарелки, ножи, препаровальные иглы, вода, краситель фуксин, предметные стекла, смесь спирта с глицерином, спиртовка, спички, микроскоп, масло иммерсионное.

1-е задание студентам.

Методика выполнения. Изучить внешний вид пораженных плодов и овощей. Описать и зарисовать повреждения. Сделать срез поврежденных плодов и овощей в продольном направлении, рассмотреть срез, описать и зарисовать.

Для выявления бактерий приготовить два препарата:

1. - на предметном стекле сделать препарат-отпечаток с пораженного участка изучаемого объекта (плоды, овощи), высушить на воздухе, зафиксировать над пламенем спиртовки, окрасить фуксином;

2. - стерильной бактериологической петлей взять материал с пораженного участка, перенести его в каплю воды на предметном стекле, растереть

по стеклу размером 2 см², высушить на воздухе, зафиксировать над пламенем спиртовки, окрасить фуксином.

Оба препарата рассмотреть с иммерсионной системой. Зарисовать. По результатам исследования сделать вывод о причине поражения плодов и овощей.

2-е задание студентам.

Методика выполнения. Для выявления на пораженных плодах и овощах плесневых грибов приготовить препарат «раздавленная капля». Препаровальной иглой часть грибницы перенести на предметное стекло в каплю смеси спирта с глицерином. Покрывать покровным стеклом и рассмотреть в объектив 40х. Зарисовать.

Для определения рода гриба по органам спороношения использовать методику приготовления фиксированных препаратов плесневых грибов. Сделать заключение о причине заболевания.

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое эпифитная микрофлора плодов и овощей?
2. При каких условиях на плодах и овощах начинают размножаться микроорганизмы?
3. Какая микрофлора плодов и овощей опасна для человека?
4. Как проводится микробиологический анализ плодов и овощей?
5. Почему повышенная влажность и температура внешней среды провоцируют болезни плодов и овощей?

Занятие 16. Микробиология воды

Цель занятия. Изучить микрофлору воды и стандартные методы санитарно-бактериологического исследования воды

Общие сведения. Вода является естественной средой обитания многих микроорганизмов, где они способны жить, размножаться, участвовать в процессах круговорота веществ в природе. Вода отражает микробный пейзаж почвы. Микрофлора природных вод различается по качественному и количественному составу. В большинстве это сапрофиты (сапротрофы), но могут встречаться патогенные и условно-патогенные виды. В водах пресных водоемов обнаруживаются палочковидные, кокковидные и извитые (*аэробные и анаэробные*) бактерии, грибы. Микрофлора воды выполняет роль активного фактора в процессе самоочищения ее от органических отходов, которые утилизируются микроорганизмами. Вместе с загрязненными ливневыми, талыми и сточными водами в озера и реки попадают представители нормальной микрофлоры человека и животных (*кишечная палочка, цитробактер, энтеробактер, энтерококки, клостридии*), возбудители кишечных инфекций (*брюшного тифа, паратифов, сальмонеллеза, дизентерии, холеры и др.*). Поэтому вода является фактором передачи возбудителей острых кишечных инфекций и других инфекционных заболеваний (*лептоспироза и др.*). Вода не является благоприятной средой для размножения патогенных микроорганизмов, но многие из них длительно сохраняют в воде жизнеспособность и болезнетворность [бруцеллы – 72 дня, туберкулезная палочка – 5 мес, некоторые патогенные вирусы – более трех мес; некоторые возбудители могут размножаться в воде (*холерный вибрион, легионеллы*)]. Вода морей и океанов содержит различные микроорганизмы, в том числе светящиеся и галофильные (*солелюбивые*), например галофильные вибрионы, поражающие моллюски и некоторые виды рыб, при употреблении которых в пищу развивается пищевая токсикоинфекция.

В количественном отношении содержание микроорганизмов в воде достаточно велико. В морской воде и в воде пресноводных водоемов общее количество микроорганизмов составляет от 10 млн до 3 млрд клеток в 1 мл.

Питьевую воду тщательно очищают и обеззараживают. Оценку качества питьевой воды осуществляют комплексно по ряду показателей (органолептические, гельминтологические, физико-химические, микробиологические). При обнаружении в воде патогенных микроорганизмов она становится непригодной к употреблению. Главное требование к качеству питьевой воды – отсутствие патогенных микроорганизмов.

Пробу воды для исследования берут на глубине 10-15 см от поверхности и на расстоянии 1,5 м от берега. Для отбора проб водопроводной воды используют стерильные флаконы вместимостью 500 мл, закрытые ватно-марлевыми пробками и покрытые бумажными колпачками. Кран предварительно обрабатывают смоченным в спирте тампоном и обжигают. После этого воду спускают в течение 10-15 мин и набирают во флаконы. Флаконы закрывают стерильными пробками. Стандартные методы исследования водопроводной питьевой воды предусматривают определение общего количества бактерий (КМАФАнМ) и количество бактерий группы кишечной палочки (БГКП).

Количество БГКП определяют двумя методами: мембранных фильтров и бродильным методом. В микробиологических лабораториях используют второй метод.

Для определения количества БГКП в воде бродильным методом засевают 100, 10, 1 и 0,1 мл исследуемой воды и добавляют концентрированную глюкозо-пептонную среду (состав среды: 100 г пептона, 50 г натрия хлористого, 50 г глюкозы на 1 л дистиллированной воды. Добавляют индикатор Андреде, рН 7,4 -7,6. Стерилизуют при 112° С 0,5 атм 12 мин). К 100 мл исследуемой воды добавляют 10 мл концентрированной глюкозо-пептонной среды, к 10 мл исследуемой воды – 1 мл среды. 1 мл и 0,1 мл исследуемой воды добавляют в среду Кесслера. Все операции повторяют трижды. Культивируют при 37° С с последующим высевом на плотную среду Эндо. Диффе-

ренцируют выросшие на среде Эндо колонии и определяют наиболее вероятное число бактерий группы кишечной палочки в 1 л воды.

Заполняют таблицу 13 и делают заключение о качестве анализируемой воды.

Таблица 13

Санитарно-микробиологические показатели воды

Категория воды	Показатели				Вывод
	Коли-титр, мл		Коли-индекс		
	норматив	результат	норматив	результат	
Вода питьевая водопроводная	не менее 300		не более 3		
Вода колодцев, родников	не менее 100		не более 10		
Вода плавательных бассейнов	не менее 300		не более 3		

Примечание. Коли-титр – это наименьший объем воды, в котором обнаруживается одна клетка БГКП, коли-индекс – это число клеток БГКП в 1 л воды.

В питьевой воде допускается не более трех клеток кишечной палочки на 1 литр воды. Обнаружение в воде бактерий группы кишечной палочки рассматривают как показатель фекального загрязнения воды, а их количество говорит о степени этого загрязнения. КМАФАнМ питьевой воды не должно превышать 100 КОЕ/мл.

Лабораторная работа 16.1 (№ 24) – Определение качества питьевой воды по общей численности бактерий

Цель работы. Определить качество питьевой воды по КМАФАнМ.

Материалы и оборудование. Образцы воды, питательная среда, пробирки, стерильная вода, чашки Петри, пипетки, спиртовка, спички, термостат.

Для исследования питьевой воды на лабораторном занятии студенты сами могут принести воду в стерильной посуде, которую им надо раздать заранее.

Методика выполнения. Из каждой пробы воды следует сделать посев так, чтобы на чашках Петри выросло от 30 до 300 колоний. На каждую чашку Петри засевают по 1 мл воды. Если вода грязная, делают её разведения и из каждого разведения засевают по 1 мл. Затем в чашки Петри заливают расплавленный и остуженный до 45°С МПА, быстро перемешивают с посевом, вращая чашку Петри, не отрывая её от поверхности стола. После застывания среды чашки Петри поместить вверх дном в термостат при 37°С на 24 ч. Колонии, выросшие на поверхности и в глубине агара, подсчитывают, оценивают только те разведения, при посеве которых на чашках Петри выросло 30 – 300 колоний.

Результат. Подсчитывают количество колоний и определяют колониобразующие единицы в 1 мл анализируемого образца. Если проводили разведение воды - умножают на разведение. Результаты заносят в таблицу 14 и делают заключение о качестве воды.

Таблица 14 - Микробиологический показатель МАФАнМ в воде

Категория воды	КМАФАнМ, КОЕ/мл		Качество воды
	норматив	результат	
Вода питьевая водопроводная	не более 100		
Вода колодцев, родников	не нормируется		
Вода плавательных бассейнов	не более 100		

Вопросы для самоконтроля

1. С какой целью определяют микробиологические показатели воды?
2. Каким образом в воду попадают микроорганизмы?
3. Почему в воде не допускается наличие патогенных микроорганизмов?
4. На что указывает обнаружение в воде бактерий группы кишечной палочки?
5. Дайте определение понятиям «коли-титр» и «коли-индекс».
6. Что такое КОЕ/мл воды?

Занятие 17. Микробиология воздуха закрытых помещений

Цель занятия. Ознакомиться с микробиологическими методами изучения санитарного состояния воздуха жилых и производственных помещений.

Общие сведения. Микрофлора воздуха связана с микрофлорой почвы и воды. В воздух попадают микроорганизмы из дыхательных путей и с каплями слюны человека и животных. Воздух является неблагоприятной средой для развития микроорганизмов, так как в воздухе нет органических веществ. Чем больше пыли, тем больше микроорганизмов в воздухе. Большое количество микроорганизмов присутствует в воздухе крупных городов, меньшее – в воздухе сельской местности. Мало микроорганизмов в воздухе над лесами, горами, морями. Так, в 1 м³ арктического воздуха содержится 1-10 клеток микроорганизмов, в морском воздухе – 1-2 клетки, в городском парке – 200 клеток, в городском воздухе – 500 клеток, в жилом помещении – 20000 клеток, на территории скотного двора – 1–2 млн клеток в 1 м³. Много микроорганизмов находится в воздухе закрытых помещений, микробная обсемененность которых зависит от степени уборки, уровня освещенности, количества людей в помещении, частоты проветривания и др. Воздух может контаминировать микроорганизмами пищевые продукты.

С целью снижения микробной обсемененности воздуха проводят влажную уборку помещений в сочетании с вентиляцией и очисткой (фильтрацией) поступающего воздуха, применяют обработку помещений лампами ультрафиолетового излучения.

Санитарное состояние воздуха жилых и производственных помещений оценивают по количеству микроорганизмов в 1 м³ воздуха (*так называемое микробное число или обсемененность воздуха*). Косвенно о наличии патогенных микроорганизмов в воздухе (*возбудителей туберкулеза, дифтерии, кори, гриппа и др.*) можно судить по наличию стрептококков и золотистого стафилококка, которые являются представителями микрофлоры верхних дыха-

тельных путей и имеют общий путь выделения с патогенными микроорганизмами, передающимися воздушно-капельным путем.

Для определения количества бактерий в воздухе используется простой метод Коха. Общую численность бактерий в воздухе учитывают методом прямого подсчета микроорганизмов.

Лабораторная работа 17.1 (№ 25) - Определение санитарного состояния воздуха закрытых помещений

Цель работы. Определить чистоту воздуха методом осаждения микробных клеток на плотных питательных средах. Оценить санитарное состояние воздуха исследуемых помещений по количеству микроорганизмов в 1 м³ воздуха.

Материалы и оборудование. Стерильные чашки Петри, питательная среда, карандаши по стеклу или маркеры, термостат.

При отборе проб воздуха используют седиментационный и аспирационный методы. *Аспирационный метод* основан на фильтрации или аспирации (просасывании) воздуха через специальные фильтры, жидкости, порошки, адсорбирующие микроорганизмы. *Седиментационный (чашечный) метод* основан на механическом осаждении микроорганизмов. Это наиболее простой способ определения обсемененности микроорганизмами воздуха закрытых помещений.

Методика выполнения. Две или три подписанные стерильные чашки Петри с питательной средой (МПА) открывают на 5 мин в исследуемом помещении на высоте 1 м от пола. Частицы пыли с бактериями под действием силы тяжести оседают на поверхность среды. Через 5 мин чашки закрывают крышками, помещают в перевернутом виде в термостат и инкубируют 48 часов при температуре 28-30° С. Осевшие микроорганизмы образуют на поверхности питательной среды колонии, которые можно подсчитать. Колонии – это размножающиеся клетки микроорганизмов, видны невооруженным глазом. Так как некоторые микроорганизмы размножаются медленно, окон-

чательный подсчет колоний проводят на пятые сутки. Подсчитывают чашки, в которых колоний больше десяти и не более 250-300.

При подсчете колоний чашки Петри просматривают в проходящем свете и, чтобы одну и ту же колонию не посчитать дважды, подсчитанные колонии отмечают карандашом или маркером. Чтобы не пропустить мелкоточечные колонии, чашки дополнительно просматривают с лупой. На площади 100 см² за 5 мин осаждаются столько бактерий, сколько их находится в 10 литрах воздуха.

Расчет. Зная площадь чашки Петри, можно подсчитать количество клеток в 1 м³ воздуха. Для этого число колоний, выросших на чашке Петри, относят к общей площади чашки, затем подсчитывают, сколько таких колоний поместилось бы на 100 см², а затем переводят на 1 м³ воздуха. Так как чашки Петри в одном помещении размещают по две или три, после подсчета в них колоний выводят среднее арифметическое.

Пример расчета. В чашке Петри диаметром 10 см выросло 50 колоний. Площадь чашки Петри (πr^2) составит $3,14 \times 5^2 = 78,5$ см². Чтобы подсчитать число клеток на 100 см² (100 см² = 10л или 0,01 м³ воздуха), составляем пропорцию

$$78,5 \text{ см}^2 - 50 \text{ колоний}$$

$$100 \text{ см}^2 - x \text{ колоний}$$

Делаем расчет:

$$x = 100 \cdot 50 / 78,5 = 63 \text{ колонии}$$

Таким образом, если на 100 см² (что равно 0,01 м³) находится 63 микробных клетки, то в 1 м³ их будет в 100 раз больше, то есть 6300 клеток. Сравниваем полученные результаты с нормативом (таблица 15) и делаем вывод о санитарном состоянии воздуха в исследуемом помещении.

Санитарная оценка воздуха помещений

Оценка воздуха		Общее число бактерий в 1 м ³		Выводы
		норматив	результат	
Лето	чистый	До 1500		
	загрязненный	До 2500		
Зима	чистый	До 4500		
	загрязненный	До 7000		

Вопросы для самоконтроля

1. Почему воздух является неблагоприятной средой для развития микроорганизмов?
2. Почему необходимо знать санитарное состояние воздуха?
3. Каким методом можно определить чистоту воздуха?
4. Как проводится расчет загрязненности воздуха микроорганизмами?

Занятие 18. Основы микробиологического и санитарно-гигиенического контроля пищевых производств

Цель задания. Ознакомление с основами микробиологического контроля пищевых производств по обеспечению выпуска доброкачественной готовой продукции, безопасной для человека

Общие сведения. Биологическая контаминация объектов окружающей среды происходит постоянно. Главным источником микробного загрязнения пищевых производств является человек: кожные покровы, выделения верхних дыхательных путей, волосы содержат сапрофитные, условно-патогенные и патогенные микроорганизмы. Особую опасность представляют больные и бактерионосители - источники возбудителей инфекционных заболеваний (брюшного тифа, паратифов, сальмонеллеза, дизентерии, холеры, вирусного гепатита, иерсиниоза, туберкулеза и др.). Они загрязняют болезнетворными микроорганизмами различные объекты внешней среды, инвентарь, столовую посуду, санитарную одежду, которые служат пассивными посредниками при передаче возбудителей инфекционных болезней здоровым лю-

ням через продукты питания. Большая часть микроорганизмов погибает в первые часы пребывания во внешней среде, за исключением спорных форм бактерий и тех, которые попадают в благоприятные условия и не подвергаются высушиванию и действию солнечных лучей.

Основной целью санитарно-гигиенического контроля на предприятиях общественного питания является сведение к минимуму микробной обсеменности пищевых продуктов, профилактика острых кишечных инфекций и пищевых отравлений. Санитарное состояние пищевых производств поддерживается путем проведения профилактических санитарно-гигиенических мероприятий. Эффективность мероприятий оценивается проводимым с определенной периодичностью микробиологическим контролем санитарного состояния производственных помещений, оборудования, инвентаря, тары, воды, воздуха, рук и санитарной одежды работников предприятий общественного питания.

По результатам санитарно-бактериологических исследований можно судить о соблюдении санитарного режима на предприятии, о возможном нарушении технологии приготовления пищи или условий хранения продуктов, о соблюдении правил личной гигиены персоналом, об эпидемиологической безопасности готовой продукции.

Санитарно-бактериологические исследования объекта проводятся планомерно и внепланово. Показателями санитарного состояния объекта при микробиологическом исследовании являются наличие БГКП и КМАФАнМ.

Отбор проб для санитарно-микробиологического исследования предметов внешней среды на наличие БГКП проводится с помощью метода смыва стерильными ватными тампонами, которые вмонтированы в стеклянную палочку и помещены в пробирку, в которой находится 3 – 5 мл стерильной среды Кесслера. На исследуемую поверхность для ограничения площади обследования накладывают рамку-шаблон площадью 100 см² (10 x 10), изготовленный из проволоки.

Перед взятием пробы шаблон стерилизуют в пламени спиртовки. Для взятия пробы тампон опускают в пробирке со средой до дна, затем увлажненным тампоном производят смыв и снова погружают в жидкость. Для взятия проб с мелкой посуды (ложки, вилки, стаканы и др.) протирают всю поверхность. Для проведения смывов с рук протирают руки тампоном, начиная с менее загрязненных участков кожи: тыльная часть ладони, ладонь, межпальцевые поверхности, ногтевые ложа и подноготное пространство. Смывы ставят в термостат при 37°С на 24 ч. При наличии брожения материал пересевают на плотную агаровую среду Эндо для идентификации кишечной палочки. Полученные результаты заносят в таблицу 16.

Таблица 16

Санитарно-микробиологическое состояние исследуемых предметов
на пищевых производствах

Исследуемые предметы	Брожение на среде Кесслера	Рост на среде Эндо	Вывод
Поверхность рабочих столов			
Поверхность стен			
Смывы с рук			
Смывы со столовой посуды, вилок, ножей и др.			

Обнаружение бактерий группы кишечной палочки в смывах - показатель неудовлетворительного санитарного состояния пищевых производств.

Лабораторная работа 18.1 (№ 26) - Санитарно-бактериологическое исследование инвентаря, оборудования, смывов с рук, одежды для определения КМАФАнМ

Цель работы. Определение общей микробной обсемененности различных объектов на предприятиях общественного питания

Материалы и оборудование. Шаблон, спиртовка, спички, чашки Петри, питательная среда (МПА), тампоны, пробирки со стерильной водой, стерильные пипетки, термостат.

Методика выполнения. Для определения общей бактериальной обсемененности объектов окружающей среды делают смывы. Стерильные ватные тампоны, вмонтированные в стеклянную палочку, помещают в пробирку, в которой находится 3 – 5 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия. Для взятия пробы тампон опускают до дна пробирки, затем влажным тампоном производят смыв и снова погружают в раствор. Объем жидкости в пробирках доводят до объема 10 мл, добавляя стерильный изотонический раствор хлорида натрия (получили разведение 1:10). Пробирку интенсивно встряхивают и в зависимости от предполагаемой загрязненности готовят десятикратные разведения (1:100, 1:1000 и т.д.). Производят посев смыва (см методику выполнения лабораторной работы 16.1). Чашки Петри помещают в термостат при 37°С на 24 ч. Подсчитывают колонии и делают расчет общей бактериальной обсемененности исследуемого объекта по формуле

$$M = n \cdot 10 / S,$$

где M – общая бактериальная обсемененность; n – количество колоний в 1 мл исходного разведения смыва; 10 – количество смачиваемой жидкости, мл; S – площадь, с которой произведен смыв, см².

Результат расчета общей бактериальной обсемененности заносят в таблицу 17 и делают вывод о санитарном состоянии объекта.

Таблица 17 – Критерии оценки предметов окружающей среды по санитарно-микробиологическим тестам

Оценка объекта	Общая микробная обсемененность, КОЕ/ см ²	Вывод
Чистый	10 ⁴	
Умеренно-загрязненный	10 ⁴ · 10 ⁵	
Сильно-загрязненный	Более 10 ⁵	

Вопросы для самоконтроля

1. Что собой представляет контроль санитарно-микробиологического состояния объектов окружающей среды?

2. Как патогенные микроорганизмы попадают в окружающую среду?
3. Происходит ли размножение патогенных микроорганизмов на предметах окружающей среды?
4. В каких случаях микроорганизмы дольше сохраняют свою жизнеспособность?
5. Что такое шаблон и какую он выполняет роль при санитарно-гигиеническом исследовании объектов на пищевых производствах?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ГОСТ Р 53430-2009. Молоко и продукты переработки молока. Методы микробиологического анализа. Введен 27.11.2009. – М.: Стандартиформ, 2010. – 12 с.
2. ГОСТ Р 52969-2008. Масло сливочное. Технические условия. Введен 13.10.2008. – М. : Стандартиформ, 2009. – 25 с.
3. ГОСТ Р 52686 - 2006. Сыры. Общие технические условия. Введен 01.01.2008. – М. : Стандартиформ, 2007. – 18 с.
4. Жарикова, Г.Г. Микробиология, санитария и гигиена пищевых продуктов: практикум /Г.Г. Жарикова, А.О. Козьмина. – М.: Изд-во ГЕЛАН, 2001.–256 с.
5. Камышева, К.С. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии / К.С. Камышева. – Ростов н/Д: Феникс, 2009. – 281 с.
6. Мудрецова-Висс, К.А., Микробиология, санитария и гигиена: Учебник (ГРИФ) / К.А. Мудрецова-Висс, В.П. Дедюхина //4-е изд., испр. и доп. – М. : ФОРУМ: ИНФРА-М, 2010. - 400 с.
7. Никитина, Е.В. Микробиология: Учебник / Е.В. Никитина, С.Н. Киямова, О.А. Решетник. – СПб.: ГИОРД, 2008. – 368 с.
8. Рубина, Е.А. Микробиология, физиология питания, санитария: Учебное пособие (ГРИФ) / Е.А. Рубина, В.Ф. Малыгина. – М.: Форум. – 2011. – 240 с.
9. Смирнов, А.В. Ветеринарно-санитарная экспертиза с основами технологии молока и молочных продуктов: учеб. пособие / А.В. Смирнов. – 2-е изд. испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2013. - 136 с.
10. Степаненко, П.П. Микробиология молока и молочных продуктов: Учебник для ВУЗов / П.П. Степаненко. – Сергиев Посад: ООО «Все для Вас-Подмосковье», 1999. – 415 с.
11. Теппер, Е.З. Практикум по микробиологии / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. - 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 1993. – 175 с.
12. Шлегель, Г. Общая микробиология: Учебник / Г. Шлегель. – М. : Изд-во Мир, 1972. – 480 с.

СОДЕРЖАНИЕ

Раздел 1 ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ.....	3
Занятие 1. Организация микробиологической лаборатории.	
Правила работы и техника безопасности	3
Занятие 2. Устройство и правила работы с микроскопом.	
Методы микроскопического исследования.....	14
Занятие 3. Методы стерилизации питательных сред и посуды.....	26
Занятие 4. Методы приготовления и способы окрашивания препаратов для микроскопирования	36
Занятие 5. Изучение морфологии микроорганизмов посредством световой микроскопии	52
Занятие 6. Морфология клеточных структур микроорганизмов	61
Раздел 2. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ СЫРЬЯ И ГОТОВОЙ ПРОДУКЦИИ.....	70
Занятие 7. Оценка качества пищевой продукции по микробиологическим показателям.....	70
Занятие 8. Методы определения некоторых групп микроорганизмов	75
Раздел 3. СПЕЦИАЛЬНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ	78
Занятие 9. Микробиология молока.....	78
Занятие 10. Микробиологический анализ сметаны, сыра, сливочного масла	87
Занятие 11. Микробиология мяса	98
Занятие 12. Микробиология рыбы и рыбопродуктов.....	104
Занятие 13. Микробиология яиц и яйцепродуктов.....	109
Занятие 14. Микробиология муки и хлеба	113
Занятие 15. Микробиология свежих плодов и овощей	117
Занятие 16. Микробиология воды	119
Занятие 17. Микробиология воздуха закрытых помещений	124
Занятие 18. Основы микробиологического и санитарно-гигиенического контроля пищевых производств	127
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	132

*Гаврилова Галина Антоновна,
Литвиненко Оксана Викторовна*

ПРАКТИКУМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

Лицензия ЛР 020427 от 25.04.1997 г.
Подписано к печати 20.01.2014 г. Формат 60×90/16.
Уч.-изд.л. – 6,0. Усл.-п.л. – 8,5.
Тираж 100 экз. Заказ 28.

Отпечатано в отделе оперативной полиграфии издательства ДальГАУ
675005, г. Благовещенск, ул. Политехническая, 86

