

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Красноярский государственный аграрный университет

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Лабораторный практикум

Красноярск 2004

Рецензент Р.А. Степень, д-р биол. наук, проф. СибГТУ

Машанов, А.И.

Микробиология пищевых продуктов: лабор. практикум / А.И. Машанов, В.В. Матюшев, Е.В. Скуратова; Краснояр. гос. аграр ун-т. – Красноярск, 2004. – 72 с.

Предназначено для студентов факультета пищевой и перерабатывающей промышленности.

Печатается по решению редакционно-издательского совета
Красноярского государственного аграрного университет

ВВЕДЕНИЕ

Микробиология – наука о мельчайших живых организмах – микробах: об их строении и биологических свойствах, о роли в различных процессах, происходящих в природе, об использовании в тех или иных областях жизни и деятельности человека, о взаимоотношениях микроорганизмов с более сложными организмами, а также о методах устранения их вредного воздействия. Микробиология пищевых продуктов разрабатывает методы получения пищевых продуктов при помощи различных микроорганизмов, а также способы предотвращения порчи пищевых продуктов, вызываемых микроорганизмами. Настоящее пособие предназначено для студентов специальностей 260201, 260202, 260204, 260401, 260504. Цель настоящего пособия – помочь студентам овладеть основными навыками микробиологических исследований. Навыки, приобретенные на лабораторных занятиях, необходимы для проведения микробиологического контроля производства. Лабораторные занятия должны быть тесно связаны с теоретическим курсом микробиологии. В пособии излагаются основные практические приемы работы в микробиологической лаборатории, приготовление и стерилизация питательных сред, воды, посуды, методы микробиологического исследования воды, воздуха, зерна, муки и хлеба, консервов, пивоваренных дрожжей. По некоторым специальным вопросам даются краткие теоретические пояснения. В конце каждой работы указаны задания, которые необходимо самостоятельно выполнить студенту, а также вопросы для самостоятельного контроля.

ПРАВИЛА РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

1. В помещении микробиологической лаборатории поддерживается чистота и порядок.
2. Входить в лабораторию и приступать к работе можно только при наличии халата и сменной обуви.
3. За каждым студентом на все время занятий закрепляется место на учебном столе и один микроскоп, за который студент несет ответственность.
4. На лабораторном столе не должно быть лишних предметов, мешающих работе (сумок, пакетов и т.д.).
5. Перед началом работы необходимо ознакомиться с ее содержанием по настоящему руководству, а затем самостоятельно выполнить указанные задания, сделать зарисовки и записи.
6. Все инструменты, соприкасающиеся в процессе работы с микроорганизмами (пипетки, шпатели, предметные и покровные стекла), по мере использования немедленно опускаются в сосуды с дезинфицирующей жидкостью. Бактериологические петли и иглы в процессе работы прокаливаются в пламени горелки.
7. В конце занятия необходимо сдать преподавателю все культуры микроорганизмов и другие материалы, а рабочее место привести в порядок.

МИКРОСКОП И ТЕХНИКА МИКРОСКОПИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Микроскоп – это сложный оптический прибор. Он имеет две составные части: механическую и оптическую.

Механическая часть состоит из штатива, в котором различают ножку («башмак»), основание и тубусодержатель, и предметного столика, прикрепляемого к основанию штатива. Предметный столик перемещается в горизонтальной плоскости с помощью двух винтов слева и справа. На поверхности столика имеются две клеммы для закрепления препарата. В центре предметного столика находится отверстие для прохождения лучей света, освещающих препарат. Тубусодержатель поднимается и опускается с помощью двух винтов – мак-

рометрического и микрометрического, предназначенных для грубой и точной фокусировки объекта.

Оптическая часть микроскопа состоит из осветительного аппарата, объективов и окуляров. Осветительный аппарат расположен под предметным столиком и состоит из зеркала, конденсора и ирис-диафрагмы. Зеркало имеет плоскую и вогнутую поверхность. При естественном освещении и больших увеличениях используют плоское зеркало, при искусственном освещении и малых увеличениях – вогнутое. Конденсор представляет собой систему линз и служит для усиления яркости освещения рассматриваемого объекта. Собирая лучи света, отраженные зеркалом, конденсор концентрирует их в плоскости зеркала. При опускании конденсора поле зрения затемняется, при поднятии – освещается. Ирис-диафрагма, встроенная в конденсор, состоит из тонких металлических сегментов, которые при помощи рычажка можно сдвигать и раздвигать, регулируя поступление света в конденсор.

Объективы являются наиболее ценной частью микроскопа. Они ввинчиваются в гнезда револьвера и состоят из системы линз, заключенных в металлическую оправу. Различают объективы сухие и иммерсионные. Сухие – при работе с которыми между линзой и рассматриваемым предметом находится слой воздуха. Иммерсионными называются объективы, линза которых при работе погружается в каплю жидкости с показателем преломления, близким к показателю преломления стекла. Этим достигается меньшее рассеивание световых лучей. Лучшим для этой цели является кедровое масло. Биологические микроскопы МБР-1 и МБИ-1 обычно имеют 3-4 объектива с обозначениями 8, 20, 40, 90X (иммерсионный), показывающими собственное увеличение этих объективов.

Окуляр вставляется в верхний конец тубуса и представляет собой систему двух плосковыпуклых линз. Окуляры помечаются цифрами, показывающими их собственное увеличение: 5, 10, 15X. Для того чтобы определить увеличение данной системы, следует умножить показатель увеличения объектива на показатель увеличения окуляра. Например, при окуляре 7X и объективе 90X увеличение микроскопа равно 630.

Основные правила пользования микроскопом

1. Микроскоп предохраняют от попадания пыли и влаги, после работы накрывают целлофаном или колпаком.
2. На рабочем столе микроскоп ставят ручкой к себе на расстоянии 3-5 см от края стола.
3. Объективы и окуляры протирают замшей или фланелью.
4. При работе с объективами малого и среднего увеличения тубус перемещать только макровинтом.
5. Не оставлять тубус открытым, т.е. без окуляра, так как это приводит к накоплению пыли и загрязнению объективов.
6. При смене объективов регулируют интенсивность освещения, опуская и поднимая конденсор
7. При работе с объективом 8X расстояние до исследуемого препарата должно быть около 1 см, с объективом x40 – 0,6 мм и с объективом x90 – около 0,15 мм.
8. При смене одного объектива другим препарат подводят точно в центр поля зрения и только после этого медленно вращают револьвер до появления щелчка.
9. После работы с иммерсионным объективом кедровое масло должно быть удалено с объектива.
10. После работы револьвер перевести на малое увеличение и на предметный столик положить салфетку.

Установка света по Келеру

1. Предварительная подготовка:
на предметный столик устанавливают препарат;
устанавливают объектив 8X;
поднимают конденсор вверх до упора;
открывают полностью диафрагму конденсора;
отодвигают матовое стекло;
ставят плоское зеркало.
Закрывают полностью диафрагму осветителя, оставив небольшое отверстие.
2. Включают осветитель и придают его корпусу такое положение, при котором свет падал бы в центр поля зрения.

3. Кладут на зеркало микроскопа кружок белой бумаги и, передвигая патрон лампы осветителя вдоль корпуса, фокусируют на бумагу изображение витка нити лампы накаливания.

4. Глядя в окуляр и поворачивая зеркало, находят в поле зрения светлое пятно. Величина пятна зависит от раскрытия диафрагмы осветителя. Чем шире диафрагма и чем выше объектив, тем больше пятно. Если оно занимает значительную часть поля зрения, уменьшают его, опустив объектив или сузив отверстие диафрагмы. Если пятно сдвинуто к краю, его переводят в центр поворотом зеркала.

5. Используя объектив $\times 8$, фокусируют объект в области светлого пятна.

6. Глядя в окуляр и слегка опуская конденсор, получают изображение светлого пятна с четко очерченными краями.

7. С помощью зеркала переводят яркое пятно в центр поля зрения. Если пятно освещено неравномерно, добиваются его равномерного освещения, слегка поворачивая корпус осветителя.

8. Открывают диафрагму осветителя не более чем на $2/3$.

9. Устанавливают объектив $\times 40$ (для препарата раздавленная капля) или $\times 90$ (для фиксированного окрашенного препарата, на который наносится иммерсионное масло) и фокусируют объект. Положение зеркала, конденсора и диафрагмы осветителя менять нельзя! Диафрагмой конденсора пользуются только для увеличения контрастности изображения, когда работают с объективом $40\times$.

Правила работы с иммерсионным объективом

Устанавливают свет по Келеру. На сухой фиксированный препарат наносят каплю иммерсионного масла. Устанавливают объектив $90\times$ и, глядя сбоку, осторожно опускают макровинтом тубус микроскопа до погружения объектива в масло. Следят за тем, чтобы фронтальная линза объектива не коснулась предметного стекла (она может легко сместиться). Затем, наблюдая в окуляр, макровинтом медленно поднимают тубус и фокусируют объект. Тонкую фокусировку осуществляют с помощью микровинта.

По окончании микроскопирования поднимают тубус, снимают препарат и осторожно протирают фронтальную линзу объектива сухой хлопчатобумажной салфеткой, а затем той же салфеткой, но слегка смоченной бензином. Нельзя оставлять масло на поверхности

линзы, так как на ней собирается пыль, и это может привести к повреждению объектива.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Как организована микробиологическая лаборатория и рабочее место в ней?
2. Как обеспечивается безопасность работы в микробиологической лаборатории?
3. Из каких частей состоит микроскоп, название отдельных частей микроскопа.
4. Как правильно устанавливать свет по Келеру?
5. Правила работы с иммерсионной системой.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 1

Тема: Микроскопирование микроорганизмов. Устройство и правила работы с микроскопом. Настройка света по Келеру. Приготовление прижизненных препаратов микроорганизмов.

Цель: Освоить приемы микроскопирования, овладеть техникой приготовления прижизненных препаратов микроорганизмов.

Оборудование и материалы: микроскопы МБР-1, предметные и покровные стекла, бактериологические петли, спиртовки, фильтры.

Микроорганизмы, рекомендуемые для наблюдения.

Чистые культуры: *Lactobacillus acidophilus* (в молоке), *Bacillus megaterium* (на МПА) *Saccharomyces cerevisiae* (на сусло-агаре).

Микроорганизмы естественных субстратов: ацидофиллина, кефира, чайного гриба, зубного налета.

Микроскопирование является обязательным приемом при повседневном санитарно-бактериологическом контроле на пищевых предприятиях. Микроскопированием определяют чистоту культур промышленных микроорганизмов, выявляют постороннюю микрофлору при микробиологическом исследовании сырья, полуфабрикатов и готовой продукции, а также на технологическом оборудовании, связанном с переработкой продуктов.

Для изучения бактерий под микроскопом готовят препараты живых и фиксированных (убитых) клеток на предметных стеклах. Предметные стекла – это пластинки из тонкого стекла размером 76х26 мм с хорошо отшлифованными краями. При микроскопировании применяют покровные стекла толщиной 0,15 - 0,17 мм и размером 18х18, 20х20, 18х24 мм. Стекла должны быть чистыми, обезжиренными и подготовленными заранее. При достаточном обезжиривании капля воды равномерно расплывается на поверхности стекла. Чистые стекла берутся только за края или пинцетом, так как пальцы оставляют на них жирные пятна.

Приготовление препаратов живых клеток

Препараты живых клеток рассматривают с «сухими системами» микроскопа. Препараты живых клеток бывают трех типов: «висячая капля», «раздавленная капля» и «отпечаток».

«Висячая капля»

Исследуемый материал (каплю суспензии микроорганизмов) бактериологической петлей или пипеткой наносят на середину обезжиренного покровного стекла, затем берут предметное стекло с лу-

ночкой, на края луночки наносят тонкий слой вазелина, и, повернув луночкой вниз, прикладывают к покровному стеклу таким образом, чтобы капля находилась в центре углубления. Предметное и покровное стекла переворачивают, и капля оказывается герметически закрытой во влажной камере и защищенной от высыхания. В качестве материала для исследования используют молодые односуточные культуры. Препарат «Висячая капля» используют для наблюдения за размножением микроорганизмов, образованием и прорастанием спор для выявления подвижности клеток к химическим раздражителям.

«Раздавленная капля»

На сухое предметное стекло наносят каплю водопроводной воды, добавляют к ней небольшое количество клеток микроорганизмов бактериологической петлей, размещивают, покрывают покровным стеклом. Капля должна быть такой, чтобы после прижимания ее покровным стеклом жидкость не выступала из-под стекла. Избыток жидкости удаляют фильтровальной бумагой. Препарат используют для установления формы клеток, их размеров и взаимного расположения, наличия или отсутствия подвижности.

«Отпечаток»

Препарат «отпечаток» используют для изучения естественного расположения клеток в колонии микроорганизмов. Из агаризованной среды, на которой исследуемые микроорганизмы растут сплошным газоном или в виде отдельных колоний, вырезают скальпелем небольшой кубик и переносят его на предметное стекло так, чтобы поверхность с микроорганизмами была обращена вверх. Затем к газону или к колонии прикладывают чистое покровное стекло и тотчас же снимают, стараясь не сдвинуть в сторону. Полученный препарат помещают отпечатком вниз в каплю воды или метиленового синего на предметное стекло.

Препараты, работа с которыми закончена, прежде чем мыть, выдерживают в дезинфицирующем растворе.

Задание

1. Ознакомиться с устройством и правилами работы микроскопа.
2. Осуществить настройку света по Келеру.
3. Приготовить препарат «раздавленная капля» суспензии дрожжей. Микроскопировать с объективами х8, х20. Поле зрения зарисовать.

4. Приготовить препарат «раздавленная капля» с бактериями естественных субстратов (молока, помутневшего рассола, зубного налета). Препарат зубного налета готовят следующим образом. На предметное стекло наносят бактериологической петлей каплю стерильного физиологического раствора или воды. Осторожно снимают зубной налет спичкой (без серной головки), растирают в капле и накрывают покровным стеклом. Микроскопировать с объективами х8, х40 и х90 с иммерсией. Провести наблюдения над активной подвижностью бактерий в препарате и зарисовать микроорганизмы в поле зрения микроскопа.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Как приготовить препарат, «висячая капля» и как рассматривать?
2. Как приготовить препарат «раздавленная капля» и как его рассматривать?
3. Как приготовить препарат «отпечаток» и как его рассматривать?
4. Как правильно держать пробирку с микроорганизмами и бактериологическую петлю?
5. Какие формы имеют бактерии?
6. В чем разница между бактериями и бациллами?
7. За счет чего бактерии передвигаются?
8. Как классифицируются бактерии?

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ №2

Тема: Приготовление препаратов фиксированных клеток. Окраска клеток по Граму.

Цель: Ознакомление с красками и методами окрашивания бактериальных препаратов, научиться готовить и окрашивать бактериальные препараты простым способом и по методу Грама.

Оборудование и материалы: набор готовых растворов красок во флаконах: основной и кислый фуксин, генцианвиолет, метиленовый синий; раствор Люголя, 96% этиловый спирт; культуры грамположительных бактерий (*Bac. Subtilis* и др.), грамотрицательных микробов (*E. coli* и др.).

Фиксированные окрашенные препараты используют для выявления ряда морфологических особенностей, количественного учета микроорганизмов, а также для проверки чистоты культуры. Эти препараты удобны тем, что могут храниться длительное время. Их приготовление включает следующие этапы: приготовление мазка, высушивание, фиксацию и окраску.

Приготовление мазка. Если колония бактерий была выращена на плотной питательной среде в чашках Петри, то предварительно намечают карандашом по стеклу со стороны доньшка колонию, из которой следует взять мазок.

Крышку чашки слегка приоткрывают левой рукой и прокаленной, быстро охлажденной на воздухе бактериологической петлей берут немного культуры из отмеченной колонии, стараясь не касаться и не захватывать при этом агаровой среды с соседних колоний. После взятия материала крышку чашки тотчас же закрывают. Исследуемый материал наносят на обезжиренное предметное стекло как для препарата «раздавленная капля» и равномерно распределяют его петлей возможно более тонким слоем по поверхности 1,5–2 см.

Если культура выращена в жидкой питательной среде, то стерильную петлю опускают в жидкость, захватывают каплю и растирают ее на предметном стекле. Либо набирают материал стерильной пипеткой.

Высушивание мазка. Препарат сушат при комнатной температуре на воздухе. Тонкий мазок высыхает очень быстро. Если высушивание мазка замедлено, препарат можно слегка нагреть в струе теплого воздуха, держа предметное стекло высоко над пламенем горелки

мазком вверх. Эту операцию проводят очень осторожно, не перегревая мазок, так как при быстрой потере влаги клетки деформируются.

Фиксация преследует несколько целей: обеспечить прикрепление клеток к стеклу и тем самым предохранить препарат от смывания; сделать мазок более восприимчивым к окраске, поскольку мертвые клетки окрашиваются лучше, чем живые; сделать безопасным дальнейшее обращение с мазком, что особенно важно, если клетки исследуемого микроорганизма являются патогенными. Фиксацию клеток осуществляют чаще всего термической обработкой. Препарат трижды проводят через наиболее горячую часть пламени спиртовки, держа предметное стекло мазком вверх. Не следует перегревать мазок, так как при этом могут произойти грубые изменения клеточных структур, а иногда и внешнего вида клеток, например сморщивание.

Окраска. Клетки микроорганизмов окрашивают главным образом анилиновыми красителями. Различают кислые и основные красители. К кислым относятся те, у которых ион, придающий окраску (хромофор) – анион. У основных красителей хромофором является катион. Примером кислых красителей может служить эозин, эритрозин, кислый фуксин; все эти красители интенсивно связываются с цитоплазматическими (основными) компонентами клетки. Основные красители – метиленовый синий, основной фуксин, генциановый фиолетовый, кристаллический фиолетовый – более интенсивно связываются с ядерными (кислыми) компонентами клетки. При исследовании микроорганизмов применяют почти исключительно основные красители, так как бактерии в отношении красителей ведут себя так, как если бы они состояли в основном из нуклеиновой кислоты. Различают простые и дифференциальные способы окрашивания микроорганизмов. При простой окраске прокрашивается вся клетка, так что становятся хорошо видны ее форма и размеры. Используется один красящий раствор, чаще всего фуксин основной или метиленовый синий. На фиксированный препарат помещают пипеткой несколько капель красящего раствора так, чтобы покрыть всю поверхность мазка: основной фуксин – на 1-2 мин, метиленовый синий – на 3-5 мин. Затем краску смывают водой, а мазок просушивают между листочками фильтровальной бумаги или на воздухе.

Сложные методы окраски применяют с целью диагностики, выявления отличительных структур микроорганизмов в случаях, когда последние не окрашиваются простым способом. К сложным методам относятся окраска по Граму, окраска спор, капсул и др.

Окраска по Граму

По отношению к окраске по Граму все виды бактерий принято делить на грамположительные и грамотрицательные. Способность окрашиваться по Граму или ее отсутствие обусловлены различием в химическом составе клеточных стенок бактерий. Главным компонентом клеточных стенок бактерий является гликопептид муреин (отсутствует в оболочке клеток животных и растений), представляющий собой гетерополимер, состоящий из чередующихся остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты и пептидов.

У грамотрицательных бактерий муреин однослойный и составляет 5 –12% сухой массы клеточной стенки. На муреине располагаются в большом количестве липопротеиды, липополисахариды, фосфолипиды. Тонкий слой муреина и повышенное содержание растворимых в спирте веществ способствует вымыванию краски и обесцвечиванию клетки.

У грамположительных бактерий клеточная стенка состоит главным образом из многослойного муреина, который составляет до 90 % сухой массы клеточной стенки. Вещества, образующие муреиновый слой грамположительных бактерий, в основном представлены полисахаридами, олигосахаридами. Обнаруживаются теихоевые кислоты (полимеры рибитфосфорной и глицеринфосфорной кислот). Оболочки грамположительных клеток богаты муреином и малопроницаемы для растворителей, и клетка сохраняет интенсивность окрашивания после обработки спиртом.

Техника окраски по Граму

1. На одном предметном стекле готовят мазки из трех-четырех культур заведомо известных грам(+) (например сарцина, сенная палочка), грам(-) (кишечная палочка) и исследуемой культуры.
2. Мазки высушивают и фиксируют пламенем спиртовки.
3. Окрашивают мазок карболовым раствором генцианвиолета в течение 1-2 мин.
4. Окраску удаляют встряхиванием, на мазок наносят раствор Люголя и выдерживают 1-2 мин до почернения мазка.
5. Сливают раствор Люголя и наносят на препарат несколько капель 96 % спирта и, слегка покачивая стекло, выдерживают его до осветления мазка.

При этом должны обесцветиться только клетки грамотрицательных бактерий. При недостаточной обработке все бактерии сохраняют окраску. При излишней – все обесцвечиваются.

6. Промывают препарат водой и дополнительно окрашивают разведенным фуксином в течение 0,5-10 мин. Краску смывают, препарат подсушивают и смотрят с иммерсией. Если препарат приготовлен правильно, то в поле зрения видны грамположительные темно-фиолетовые клетки и, наряду с ними, бледнорозовые грамотрицательные.

Задание

1. Выбрать одну или несколько колоний, выросших на МПА в чашках Петри, отличающихся внешним видом и хорошо изолированных друг от друга, отметить их карандашом со дна чашки. Описать особенности отмеченных колоний по следующим признакам:

- а) размер колоний (диаметр);
- б) форма колоний (круглые, неправильной формы и т.д.);
- в) цвет колоний (белый, желтый и т.д.);
- г) поверхность колоний (блестящая, матовая, складчатая, сухая, морщинистая и т.д.);
- д) край колоний (ровный, извилистый, зубчатый и пр.);
- е) консистенция (слизистая, крошащаяся и т.д.).

2. Приготовить фиксированные препараты из выбранных колоний микроорганизмов (*Micrococcus*, *Sarcina*, *Bac. subtilis*, *Bac. typhoides*) и покрасить фуксином. Микроскопировать все препараты с иммерсионным объективом х90. Описать и зарисовать, обратив внимание на форму и сочетание клеток.

3. Выяснить отношение исследуемых культур микроорганизмов к окраске по Граму. В качестве контрольных использовать культуры *Bac. subtilis* (грам+) и *Escherichia coli* (грам-). Микроскопировать с иммерсионным объективом х 90. Поле зрения зарисовать.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Что такое плотная питательная среда для микроорганизмов?
2. Какие необходимые компоненты входят в состав питательных сред для микроорганизмов?
3. Как подразделяются питательные среды?
4. Назовите простой метод окраски микроорганизмов?
5. Назовите сложный метод окраски микроорганизмов?
6. Что достигается окраской по Граму и ее сущность?
7. Техника приготовления мазка?

8. Техника окраски по Граму?
9. Как изучают и описывают колонии микроорганизмов?
10. Что такое идентификация микроорганизмов и как устанавливают их систематическое положение?

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ №3

Тема: Морфология актиномицетов, грибов, дрожжей.

Цель: Ознакомиться с морфологией актиномицетов и грибов и техникой их микроскопирования.

Оборудование и материалы: культуры актиномицетов, микроскопических грибов (мукор, ризопус, аспергиллус, пенициллиум, молочная плесень, кладоспориум, катенулярия, альтернария), пробирки со взвесью дрожжей и дрожжи, выращенные на гипсовых блоках, предметные и покровные стекла, препаровальные иглы, смесь равных объемов этилового спирта и глицерина.

Актиномицеты, или лучистые грибы, относятся к прокариотам. У них имеется одноклеточный несептированный мицелий, окрашивающийся грамположительно. Он состоит из сплетения тонких нитей – гиф различной длины. Мицелий весьма сходен с мицелием грибов, но гифы значительно тоньше (от 0,1 до 1,5 мкм). Актиномицеты хорошо растут на плотных питательных средах. Развиваются при температуре 32 – 37 °С, рН – 6,8 – 7,4. У актиномицетов, выращенных на плотных питательных средах, различают три типа мицелия: субстратный, надсубстратный и воздушный. Субстратный развивается в глубине среды. Надсубстратный – на поверхности среды, разрастаясь густым сплетением в колонии. Воздушный мицелий образуется на поверхности колонии. Нити его отходят от мицелия колоний, разрастаются в густую, пушистую, бархатистую или мучнистую массу. Колонии могут быть плотными, кожистыми. Поверхность колоний бывает гладкой, бугристой, складчатой, зернистой. Многие актиномицеты образуют пигмент разных цветов: розовый, красный, зеленый, бурый, черный.

Мукоровые грибы (Mucor) имеют мицелий, состоящий из одной сильно разветвленной клетки, от которой отходит один спороносящий гиф – спорангиеносец. На конце гифа образуется закругленное цилиндрическое образование – колумбелла. На ней находится спорангий со спорами. На спорангиеносце после освобождения спор остается колонка, а в нижней ее части – воротник.

Молодые 3-4 суточные колонии грибов, выращенные на среде Чапека, можно рассматривать непосредственно в чашках Петри. При этом не нарушается строение органов спороношения и они хорошо различимы даже при микроскопировании с объективом х 8. Для на-

блюдения нужно открыть чашку Петри, поместить ее на столик микроскопа и, пользуясь объективом $\times 8$ и макровинтом, найти органы плодоношения исследуемых грибов. Для более детального знакомства с особенностями строения разных видов грибов готовят препарат «раздавленную каплю». Для этой цели двумя бактериологическими иглами, предварительно обожженными в пламени спиртовки, отделяют от питательной среды часть грибной колонии и помещают ее в каплю воды и глицерина (1:4). На предметном стекле пленку расправляют и накрывают препарат покровным стеклом. При изготовлении препарата муковых грибов иглами захватывают только воздушный мицелий, не касаясь питательной среды. Очень аккуратно переносят кусочек мицелия в каплю смеси и накрывают покровным стеклом, слегка придавливая. Покровное стекло во избежание образования пузырьков воздуха нужно опускать медленно. Предметные стекла подогревают до легкого закипания воды. При микроскопировании мицелия мукора выявить одноклеточное строение мицелия и органы размножения – спорангий со спорами, спорангиеносец. Рассмотреть их при увеличении объектива $\times 40$ по всей длине, передвигая препарат. В препарате всегда отмечается большое количество свободно лежащих спор, высыпающихся из лопнувших спорангиев.

Ризопус (Rhizopus) – грибы, имеющие подобие корневых волосков. Отличаются от мукоров тем, что от мицелия отходят побеги – столоны, напоминающие усы клубники. С помощью этих побегов этот гриб поднимается вверх по стенкам стеклянных сосудов, к которым он прикрепляется своими нитями – ризоидами. При развитии волосков образуется узел, из которого отходят спорангиеносцы. Расположенные пучком стволы спорангиев расширяются на конце и образуют так называемую апофизу. Образование апофизы служит характерным признаком рода ризопус. Вначале спорангии белоснежны, а в зрелом состоянии черны. У гриба ризопус при микроскопировании обратить внимание на столоны, отходящие от мицелия, спорангиеносцы, апофизу.

Аспергилловые грибы (Aspergillus) имеют септированный мицелий, конидиеносцы на вершине образуют расширение в виде головки, от которой отходят разветвления – стеригмы с отшнуровывающимися от них конидиями. У разных видов плесени конидии окрашены различно (черные, светло-зеленые и др.) и часто покрыты тонкими щетинками. Для приготовления препарата гриба рекомендуется брать воздушный мицелий. При микроскопировании установить наличие

одноклеточного (несептированного) конидиеносца, на его конце – булавовидное вздутие, на котором расположены стеригмы с конидиями.

Пенициллиум (Penicillium) имеет ветвящийся септированный мицелий (толщина нитей 2-3 мкм). От мицелия отходят расположенные в виде цепочек конидии – споры гладкой шаровидной формы. У разных видов гриба споры неодинакового цвета – белые, зеленые и др. Для микроскопирования нужно брать более молодую, зеленую часть мицелия – на границе с ее белым краем, используя для этого препаровальные иглы.

Кладоспориум (Cladosporium) встречается на сыре, яйцах, внутримасла, на колбасе, мясе. Может развиваться при малом доступе кислорода. Мицелий окрашен в оливково-зеленый цвет, на концах воздушных нитей расположены овальные споры в виде гроздей, окрашенных в тот же цвет, что и мицелий. Эти грибы способны выделять темный пигмент, который окрашивает находящуюся под их колониями среду. Для приготовления препарата берут небольшой кусочек воздушного пушистого мицелия, при микроскопировании с объективом х 40 найти длинные многоклеточные конидиеносцы, на концах которых располагаются конидии (длинные, круглые, лимонообразные).

Альтернария (Alternaria) – возбудитель черной гнили – болезни у корнеплодов и плодов. От мицелия гриба отходят короткие конидиеносцы, на которых находятся многоклеточные конидии округло-грушевидной или заостренно-вытянутой формы, расположенные в одиночку или короткими цепочками. Для приготовления препарата берут мицелий в его чистых участках. При микроскопировании найти крупные многоклеточные темноокрашенные конидии, расположенные на коротких конидиеносцах.

Молочная плесень (Endomyces lactis) растет при доступе кислорода в кислой среде. Мицелий белый септированный. В мазках представляет собой нити 5-4 мкм в диаметре и 300 –500 мкм в длине. Споры и конидии отделяются непосредственно от конца мицелия в виде прямоугольных или овальных клеток, напоминающих дрожжевые, окрашиваются грамположительно. В виде пушистого белого налета появляются на кисломолочных продуктах, поверхности огуречного рассола, стенах сырых помещений. Для приготовления препарата гриба снять бактериологической петлей его белый налет. При мик-

роскопировании установить многоклеточность мицелия и отсутствие специальных органов размножения.

Дрожжи – это одноклеточные грибы, широко распространенные в природе. Они часто встречаются в почве, в воде, на плодах, листьях винограда, ягодах, оставляя их эпифитную микрофлору. Многие виды используются в разных отраслях – хлебопечении, пивоварении, виноделии, получении спирта. Имеются вредители, вызывающие порчу пищевых продуктов и нарушающие ход бродильных процессов.

В настоящее время установлено, что дрожжи имеют разные корни происхождения, однако большинство дрожжей, имеющих наиболее важное значение в практике, отнесены к классу аскомицетов. При определенных условиях развития их клетки превращаются в аски (сумки), внутри которых образуются споры. При выращивании дрожжей на плотных питательных средах образуются колонии разного цвета, формы и консистенции. В большинстве своем они круглые, гладкие, выпуклые, плотные, реже слизистые. По цвету они могут быть белыми, кремовыми, желтовато-оранжевыми, розовыми и других оттенков. Форма и цвет колоний имеет значение при диагностике дрожжей. По форме клетки дрожжей бывают круглые, овальные, яйцевидные, лимоновидные и др. Строение клетки типичное для эукариотов, размеры варьируют в длину от 2-3 мкм до 20-50 мкм, в ширину не превышают 10 мкм. Клетки дрожжей богаты питательными веществами – белками, жиром, витаминами и могут быть использованы для кормовых целей.

Размножение дрожжей осуществляется разными способами. Наиболее обычным способом вегетативного размножения, которое характерно для большинства дрожжевых организмов, является почкование. Некоторые виды размножаются делением. Кроме почкования и деления многие дрожжи способны размножаться с помощью спор. У некоторых дрожжей образованию сумок со спорами (асков) предшествует половой процесс, иногда споры образуются без предварительного слияния клеток. Спорообразование у дрожжей – это одновременно процесс размножения и средство к сохранению жизнеспособности в неблагоприятных условиях.

Все дрожжи, которые размножаются почкованием и способны к спорообразованию, называют истинным. Все они активно сбраживают сахара с образованием спирта и углекислого газа и широко используются в производстве спирта, хлебопекарном производ-

стве, в виноделии и пивоварении. Такие дрожжи объединены в семейство *Saccharomycetaceae* и их относят к аскомицетовым дрожжам. Типичным представителем являются дрожжи вида *Saccharomyces cerevisiae* хлебопекарные, пивные и спиртовые дрожжи. Дрожжи, размножающиеся почкованием, но не способные образовывать споры, называют несовершенными. Многие из них не способны к спиртовому брожению (или сбраживают сахар очень слабо) и являются в большинстве своем вредителями бродильных производств. Такие дрожжи отнесены к несовершенным грибам (класс дейтеромицетов).

Род *Torulopsis* – клетки круглые, размножаются почкованием, часто встречаются в замутившемся пиве, придавая ему неприятный привкус.

Род *Candida* (пленчатые дрожжи) имеют вытянутые клетки, на поверхности питательной среды образуют плотные пленки, окисляют спирт до CO_2 и H_2O . Являются вредителем бродильных производств.

Оба рода являются ненужной примесью в прессованных хлебопекарных дрожжах, отрицательно влияют на процесс производства хлебобулочных изделий.

Некоторые дрожжи, из группы несовершенных, способны активно размножаться на различных субстратах, и в короткое время накапливают в своих клетках большое количество белков, жира, витаминов и других питательных веществ. Такие виды, как *Torulopsis utilis*, *Candida tropicalis* являются хорошим кормовым средством и служат ценной белково-витаминной добавкой к различным кормам. Для их производства используются отходы спиртовой, сахарной и целлюлозно-бумажной промышленности.

При изучении морфологии дрожжей следует отметить, что в зависимости от условий выращивания и продолжительности развития активность размножения их может резко меняться. Интенсивное размножение характерно для молодых дрожжей (12-16 часовая культура). У зрелых (24-48 часовая культура) процесс размножения почкованием замедляется. При наблюдении зрелых дрожжей в поле зрения микроскопа встречается обычно 2-4% мертвых дрожжевых клеток.

Мертвые клетки выявляются с помощью окрашивания препарата метиленовой синью. Раствор метиленовой сини проникает только через оболочки мертвых клеток, в результате чего последние окрашиваются в интенсивно голубой цвет, тогда как живые клетки остаются бесцветными.

Старые дрожжи (46 часовые и более) не размножаются и их характерным признаком является наличие большого числа мертвых клеток.

Задание 1

Ознакомиться с характерными особенностями строения мицелия и органов спороношения грибов *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Endomyces* при микроскопировании 3-4-суточных колоний непосредственно в чашках Петри.

Зарисовать органы спороношения указанных грибов.

Задание 2

Приготовить препараты грибов *Aspergillus*, *Penicillium* в капле смеси глицерина с водой. Просмотрев приготовленные препараты с объективом х 8 (общую картину строения) и заметив участок наиболее четко отражающий характер плодоношения данного гриба, поставить объектив х40 и при этом увеличении зарисовать гифы, органы спороношения и споры.

Задание 3

1. Исследовать разные виды аскомицетовых и несовершенных дрожжей, а именно:

Аскомицетовые	а) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(чистая культура);
	б) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(пресованные);
	в) <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ;	(делящиеся)
Несовершенные	г) <i>Candida mycoderma</i> ;	
	д) <i>Torulopsis alba</i> ;	
	е) <i>Oidium lactis</i> .	

2. Приготовить в капле воды препараты указанных видов дрожжей на предметных стеклах.

3. Окрасить препараты раствором метиленовой сини до темноголубого окрашивания.

4. Накрыть препарат покровным стеклом и смотреть с увеличением х 600. Отметить наличие светлых почкующихся (живых) клеток в окрашенный синий цвет (мертвых). Сделать рисунки всех видов дрожжей.

5. Проанализировать состав «пресованных» дрожжей. Уметь отличать «истинные» от «несовершенных».

6. Найти «истинные» сахаромицеты со спорами.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Каковы основы систематики грибов?
2. Строение грибов?
3. Что такое мицелий, виды мицелия?
4. Как размножаются грибы?
5. Техника приготовления препаратов для микроскопии грибов.
6. На какие классы, группы подразделяются грибы?
7. Что такое дрожжи?
8. Каково строение дрожжевых клеток?
9. Каково систематическое положение дрожжей?
10. Как размножаются дрожжи?

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ №4

Тема: Методы стерилизации. Лабораторная посуда, инструменты и их подготовка. Характеристика и приготовление питательных сред.

Цель: Ознакомление с режимами пастеризации, методами стерилизации, с устройством и правилами работы приборов, используемых для горячей и холодной стерилизации, с техникой приготовления питательных сред, с особенностями стерилизации питательных сред, посуды и материалов.

Оборудование и материалы: чашки Петри, пипетки, матрацы, пробирки со штативами, колбы на 250, стаканчики, мерные цилиндры, воронки, вата, марля, нитки, бумажные фильтры; весы, рН-метр, термостат, автоклав, электроплитка; мясная вода, пептон, хлорид натрия, агар-агар, неохмеленное солодовое сусло, NaNO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , KCl , FeSO_4 , сахараза, вода дистиллированная.

Методы стерилизации

Пастеризация — это термическая обработка продуктов при температуре ниже 100°C с последующим охлаждением до температуры $6-9^\circ\text{C}$. Пастеризация, как правило, убивает неспоровые болезнетворные микроорганизмы и сокращает общую бактериальную загрязненность продукта, что повышает его стойкость. Пастеризацию проводят при производстве молока, вин, икры, фруктовых соков и других продуктов.

Существует три режима пастеризации: длительная — при температуре $63-65^\circ\text{C}$ в течение 20-30 мин, кратковременная (быстрая) — при 75°C , экспозиция от нескольких секунд до 5 мин, моментальная — при $90-93^\circ\text{C}$ без выдержки.

Стерилизацией, или обеспложиванием (*sterilis* — бесплодный), называется полное уничтожение микроорганизмов в питательных средах, посуде и других объектах.

Стерилизация должна обеспечивать уничтожение всей микрофлоры, патогенной и непатогенной, на данном объекте. Ряд лекарственных и биологических препаратов (вакцин, сывороток), а также диагностических (туберкулин, малеин и др.) используется в стерильном виде. Широкое применение стерилизация нашла в пищевой промышленности, особенно в консервной.

В зависимости от физических свойств стерилизуемых предметов и цели стерилизации применяют разные методы обеспложивания: го-

рячий (влажная, дробная, сухая стерилизация) и холодный (механическая стерилизация, ионизация, стерилизация ультразвуком).

Стерилизовать кипячением можно металлические инструменты, шприцы, иглы. С этой целью используют стерилизаторы, нагреваемые на пламени горелки или с помощью электронагревательных приборов.

Кипячение убивает вегетативные формы бактерий и споры некоторых бацилл (например, *Bac. anthracis* и др.).

Однако даже продолжительное кипячение не обеспечивает гибели спор ряда анаэробных бацилл: *Cl. sporogencs*, *Cl. perfringens*, *Cl. botulinum*, выдерживающих кипячение более 3 ч.

Стерилизация паром под давлением (автоклавирование) — самый эффективный в бактериологической практике способ стерилизации, так как с его помощью быстро достигается полное и надежное обеспложивание, ведущее к гибели не только вегетативных, но и споровых форм наиболее устойчивых бацилл. Губительное действие высокой температуры обусловливается повреждением коллоидного состояния плазмы, денатурацией белка с последующей коагуляцией его, а также нарушением ферментных систем микроорганизмов. Этот способ стерилизации основан на том, что образующийся в автоклаве при кипячении воды пар не выходит наружу, а скапливаясь в замкнутом пространстве, повышает давление. Горячий водяной пар быстро проникает в живые клетки микробов и вызывает их гибель. Действие горячего пара будет эффективнее при увеличении давления, так как при этом повышается температура пара. Стерилизация насыщенным паром под давлением проводится в автоклавах.

В основе метода *дробной стерилизации* положен следующий принцип: при нагревании до 100°C в течение 30-60 мин погибают все вегетативные формы микроорганизмов, споры остаются жизнеспособными, а в промежутке между стерилизацией прорастают в вегетативную форму. Через сутки проводят повторную стерилизацию. Обычно после третьей стерилизации достигается полное обеспложивание объекта.

Стерилизация текущим паром проводится в аппаратах Коха или текуще-паровых аппаратах (кипятильниках Коха). Стерилизовать текущим паром можно и в автоклаве. Крышку автоклава не привинчивают, выпускной кран оставляют открытым, пар свободно выделяется наружу. Время, необходимое для стерилизации, отмечают с момента выхода непрерывной струи пара, когда температура достигает 100°C.

Текучим паром стерилизуют питательные среды, не выдерживающие температуры выше 100°C (желатин, молоко, углеводные среды).

Тиндализация — это дробная стерилизация при низкой температуре, предложенная Тиндалем для объектов, не переносящих температуры 100°C (среды с кровью, кровяной сывороткой, яичным белком). Их подвергают нагреванию в течение 5-6 дней подряд при температуре $56-58^{\circ}\text{C}$ по 1 ч ежедневно (в 1-й день — в течение 2 ч). В промежутках между прогреванием стерилизуемая жидкость хранится в термостате. При этом оставшиеся в живых споры прорастают в вегетативные клетки, которые погибают при последующем нагревании. Тиндализацию проводят в специальных приборах с терморегулятором или на водяных банях

Прокаливание на огне, т. е. обжигание с поверхности (фламбирование), — очень быстрый и надежный способ стерилизации. Прокаливание применяют при стерилизации бактериологических петель, игл перед посевами, мелкого металлического инструмента (пинцетов, скальпелей), предметных стекол. Перед использованием их прокалывают в пламени спиртовки или газовой горелки.

Стерилизация сухим жаром (сухим нагретым воздухом) проводится в особых аппаратах — печах Пастера или сушильных шкафах.

Стерилизуют сухим жаром стеклянную посуду, пипетки, чашки Петри. Режим стерилизации (продолжительность) сухим жаром при температуре 150°C в течение 1-1,5 ч.

По окончании стерилизации печь открывают только после того, как она остынет (в противном случае вследствие резкой разницы температур стеклянные предметы могут лопнуть).

Механическую стерилизацию (фильтрование) применяют для стерилизации жидкостей в тех случаях, когда их нельзя подвергнуть нагреванию (сыворотка, ряд лекарственных веществ). Жидкости фильтруют через специальные фильтровальные приборы, которые имеют настолько мелкие поры, что на своей поверхности задерживают все механические, взвешенные в жидкости частицы, в том числе и микробы. Для фильтрации в микробиологии применяют различные приборы.

Ультрафиолетовое излучение в мясной промышленности применяют для облучения туш, которые не предназначены для длительного хранения, для стерилизации поверхности колбас, для стерилизации воздуха и поверхностей различных помещений, в холодиль-

никах и цехах предприятий молочной промышленности и мясокомбинатов.

Стерилизацию ультрафиолетовыми лучами проводят с помощью бактерицидных ламп из увиолевого стекла БУВ-15, БУВ-30 номинальной мощностью 15 и 30 Вт.

Кроме того, ультрафиолетовые лучи используют для стерилизации воды и напитков, рассолов, поверхности сыров, для облучения молока с целью обогащения его витаминами группы D.

Кроме ультрафиолетового излучения для стерилизации используют также ионизирующее излучение и ультразвук.

Химическая стерилизация имеет ограниченное применение. В лабораторной практике используют некоторые химические вещества, такие, как толуол, хлороформ, эфир и другие, для предупреждения бактериального загрязнения питательных сред. Для освобождения от консерванта среду нагревают на водяной бане при 56°C.

Для дезинфекции поверхностей в лабораториях применяют раствор хлорамина (1-3%), фенола (3-5%), спирта (70%)

Подготовка посуды к стерилизации

В посуде, предназначенной для питательных сред, нельзя хранить дезинфицирующие вещества, так как следы последних могут оказать губительное действие на микробы при их выращивании в такой посуде. Посуду для желатина и для сред с углеводами предварительно стерилизуют в сушильном шкафу в течение 1-2 ч при 165-170°C. Посуду для бульона и агара стерилизуют в автоклаве вместе со средой с ватными пробками.

Ватные пробки обычно делают из гигроскопической ваты, которая лучше обеспечивает стерильность субстрата в посуде, так как густое сплетение нитей ваты задерживает поступление в сосуд микробов, находящихся в окружающей среде. Длина пробки не более 3 см. Она должна свободно входить в пробирку на 1,5-2 см, быть достаточно плотной, сохранять свою форму при многократном открывании и закрывании пробирки. Пробки приготавливают на специальной машинке. Для изготовления пробки вручную берут вату и закручивают крепко валиком. Нужно учесть, что слишком плотные пробки затрудняют снабжение культур воздухом. Готовые пробки лучше обшивать марлей

Чашки Петри завертывают каждую отдельно, но можно завертывать вместе по 3-4 чашки. В концы пипеток, которые при работе берут в рот, вставляют ватные тампоны. Пипетки заворачи-

вают в длинные полоски бумаги шириной 4-5 см. Обмотку начинают с конца, следя за тем, чтобы конец пипетки был тщательно завернут бумагой. Движением полоски бумаги по спирали заканчивают обмотку у противоположного конца — того, который берут в рот. Завернутые пипетки перед стерилизацией по несколько штук заворачивают в бумагу или помещают в специальные металлические или картонные пеналы Шпатели также заворачивают отдельно в бумагу. Колбы, пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками, на колбу надевают бумажные колпачки, предохраняющие горлышко от пыли.

Посуду, подготовленную для стерилизации, помещают в сушильный шкаф или автоклав не слишком плотно, чтобы не затруднять циркуляцию воздуха и обеспечить равномерный прогрев стерилизуемого материала.

Нельзя обертывать пробки сосудов целлофаном или другими материалами, не пропускающими пар. Пар должен свободно проникать через пробку в сосуд, в противном случае среды не прогреваются до нужной температуры и стерилизации не происходит.

Питательные среды

Питательные среды, применяющиеся для культивирования микроорганизмов должны содержать достаточное количество необходимых для их развития органических веществ — белков, жиров, углеводов, витаминов, минеральных микро- и макроэлементов. По происхождению различают среды естественные и искусственные.

Естественные (натуральные) питательные среды представляют собой продукты животного происхождения (кровь, сыворотка крови, молоко, желчь и др.) или растительного происхождения (овощи, фрукты, злаковые), которые используют для культивирования микроорганизмов без специальной обработки с полным сохранением их естественных свойств.

Искусственные (полусинтетические) питательные среды готовят из продуктов переработки растений, мяса, молока, печени и др., часто с добавлением к ним углеводов, поваренной соли, красок и т. п.

Среди искусственных сред выделяют *синтетические среды*, т. е. среды с точно известным химическим составом. Искусственные питательные среды подразделяются на простые, или обычные, и сложные.

Простые питательные среды служат для культивирования большинства микроорганизмов.

Сложные (специальные) среды предназначены для культивирования микроорганизмов, не растущих или плохо растущих на простых питательных средах.

Элективные (избирательные) среды. Наличие определенного состава и концентрации питательных веществ, микроэлементов, ростовых и других факторов при строгом значении рН обуславливает оптимальные условия для культивирования одного или нескольких видов микроорганизмов. При посеве из материала, содержащего смесь микробов, интенсивно проявляется рост того вида, для которого созданы наиболее благоприятные условия для развития.

Дифференциально-диагностические питательные среды используют для определения видовой принадлежности культуры микроорганизма для отличия одного вида бактерий от другого. В лабораторной практике наиболее часто применяют среды с содержанием углеводов, например среды Эндо, Левина, Плоскирева для дифференциации бактерий группы кишечных палочек от сальмонелл.

Белковой основой всех сред является питательный бульон. Наиболее распространенными простыми питательными средами являются мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), мясопептонный желатин (МПЖ).

Основой для приготовления МПБ, МПА, МПЖ является мясная вода. Ее приготавливают следующим образом: мясо освобождают от костей, сухожилий, связок и жира, измельчают на мясорубке в фарш, который заливают двойным количеством воды, варят в течение 1,5-2 ч или настаивают в холодном месте в течение суток. Затем фильтруют через марлевый и бумажный фильтры, разливают в колбы и стерилизуют в течение 20-30 мин при давлении 0,1 МПа.

Для приготовления пептонной воды к 1 л водопроводной воды добавляют 10 г (1 %) пептона и 5 г (0,5 %) химически чистой поваренной соли. Среду подщелачивают едким натром до слабощелочной реакции (рН 7,4-7,5), затем кипятят, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в колбы или пробирки и стерилизуют в течение 15-20 мин при 0,1 МПа.

По консистенции питательные среды бывают *жидкие, полужидкие и плотные*. Для приготовления плотных сред в жидкие среды добавляют агар-агар 2-3%-й концентрации, для полужидкой – агар-агар 0,2-0,3 %-й концентрации.

Агар-агар представляет собой продукт переработки высушенных морских водорослей, состоящий в основном из полисахаридов.

Агар не переваривается и не разжижается продуктами жизнедеятельности большинства микроорганизмов. Как питательное вещество агар-агар микробами не используется. Плавится агар при температуре 100°C и затвердевает при температуре около 40- 43 °С.

Жидкие питательные среды. МПБ готовят, добавляя к 1 л мясной воды 1 % пептона (продукт гидролиза белков мяса, содержащий альбумозы, пептоны и аминокислоты) для обогащения среды азотистыми веществами и 0,5% химически чистой поваренной соли, после чего подщелачивают среду путем добавления едкого натра для установления слабощелочной реакции среды (рН 7,4-7,5), кипятят, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в колбы или пробирки и стерилизуют в течение 15-20 мин при давлении 0,1 МПа.

Для стабилизации рН рекомендуется к бульону перед автоклавированием добавлять фосфатные буферные смеси.

Плотные питательные среды. Для приготовления МПА к 1 л МПБ добавляют 2-3 % мелко нарезанного агар-агара и расплавляют в автоклаве или текучепаровом котле. После расплавления агара его охлаждают до температуры 80°C, проверяют рН и доводят до рН 7,4-7,6. Для просветления среды добавляют белок одного куриного яйца, тщательно взбивают до образования пены и смешивают с двойным количеством холодной воды. Агар помещают в автоклав или кипятят в течение 10-15 мин. Хлопья свернувшегося белка адсорбируют все взвешенные частицы. Фильтруют агар через слой ваты в горячем состоянии, используя для этой цели двусменную воронку для горячего фильтрования, затем разливают в пробирки или колбы и стерилизуют в автоклаве в течение 20 мин при давлении 0,1 МПа.

Для приготовления скошенного МПА пробирки с расплавленным горячим агаром раскладывают наклонно под углом 5-6° и оставляют до полного застывания; если пробирку со стерильным расплавленным МПА поставить в штатив, можно получить агар столбиком.

Для культивирования дрожжей и микроскопических грибов часто используется *среда Сабуро*: к 100 мл стерильной дрожжевой воды добавляют 1 % пептона, 2 % агара, после растворения агара вносят 4 % глюкозы или мальтозы, фильтруют, разливают в пробирки или чашки Петри и стерилизуют при 0,05 МПа в течение 20 мин. Среду можно готовить и на обычной 1 %-й пептонной воде.

Сусло-агар: пивное сусло разводят водопроводной водой до содержания сахара 7-8 %, Стерилизуют в бутылках при 110°C в течение

10 мин. К 1 л стерильного суслу добавляют 1,8% агара, нагревают до растворения, разливают в стерильные пробирки (чашки Петри) и стерилизуют при 0,05 МПа в течение 10 мин.

Для культивирования мицелиальных грибов кроме сусло-агара в практике широко используются синтетические среды, в частности *агар Чапека* в составе: на 1 л воды NaNO_3 – 3г, KH_2PO_4 – 1г, MgSO_4 – 0,5г, KCl – 0,5г, FeSO_4 – 0,01г, сахарозы – 30 г. После растворения указанных веществ прибавляют в раствор 2,5% агара для получения твердой среды и стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм в течение 20 мин или дробной стерилизацией.

Многие стандартные питательные среды (МПБ, МПА, агар Эндо и др.) в настоящее время выпускают в виде сухих порошкообразных концентратов. Из них в лабораторных условиях готовят среды, используемые в работе.

Для культивирования различных видов микроорганизмов на питательных средах необходимо устанавливать определенную реакцию среды, которая выражается показателем концентрации водородных ионов (рН). При кислой реакции концентрация водородных ионов больше концентрации гидроксильных ионов, а при щелочной реакции – наоборот. При нейтральной реакции количество тех и других равно.

Большинство бактерий культивируют в *слабощелочной* среде (рН 7,2-7,6).

Задание

1. Ознакомиться с устройством и правилами работы автоклава, сушильного шкафа, термостата.
2. Подготовить посуду (пипетки, колбы и др.) для стерилизации (завернуть в бумагу, приготовить пробки).
3. Приготовить питательную среду МПБ, МПА и агар Чапека.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Что такое стерилизация, основные методы?
2. Как проводится стерилизация горячим воздухом?
3. Как проводится стерилизация паром под давлением?
4. Как устроен автоклав?
5. Что такое пастеризатор?
6. Что такое дробная стерилизация?
7. Как действуют на микроорганизмы ультрафиолетовое излучение?

8. Как проводится стерилизация текучим паром?
9. Как проводится стерилизация сухим паром?
10. Что такое стерилизация фильтрованием?
11. Как готовится посуда для стерилизации?
12. Как готовятся жидкие питательные среды?
13. Как подразделяются питательные среды?
14. Какие известны сложные питательные среды?
15. Как проводится посев на микроорганизмы?
16. Как готовятся сложные питательные среды?

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 5

Тема: Методы посева и культивирования микроорганизмов.

Количественный учет микроорганизмов.

Цель: Ознакомление с методами посева бактерий на плотные и жидкие питательные среды и методами выделения чистых культур.

Оборудование и материалы: питательные среды: МПА, МПБ в пробирках. Пробирки с бактериальной культурой для посева, бактериологические петли, стерильные пипетки, чашки Петри, стерильный шпатель, карандаши по стеклу, спиртовки, взвесь смешанных культур микроорганизмов

Культивирование микроорганизмов на питательных средах осуществляется посевом. Посевом называется внесение в стерильную питательную среду какого-либо исследуемого материала для выявления в нем микроорганизмов. Посевы применяются для определения количественного и качественного состава микрофлоры в любом исследуемом объекте: воде, пищевых продуктах, воздухе помещений, поверхности оборудования и т.д. Посев на твердые питательные среды проводят двумя способами: глубинным или «газоном»

Порядок проведения посева «газоном»

1. Перед началом работы дезинфицировать поверхность стола и руки, протирая их ватным тампоном, смоченным в 96 % этаноле.

2. Зажечь спиртовку.

3. Пробирку с засеваемой или пересееваемой культурой бактерий и стерильным МПА взять в левую руку и держать в наклонном положении большим и указательным пальцами (пробирка со средой дальше от себя, а пробирка со средой – ближе к себе). Пробирки должны быть обращены в сторону пламени (поверхность агара сверху).

4. В правую руку взять бактериологическую петлю и прокалить ее над пламенем до красного цвета, затем быстро провести через пламя 2 –3 раза петледержатель.

5. Мизинцем и безымянным пальцем правой руки взять одновременно наружные концы ватно-марлевой пробки двух пробирок, вынуть их около пламени из пробирок, обжигая края обеих пробирок. При этом следят за тем, чтобы часть пробок, входящих в пробирки, ни к чему не прикасалась.

6. В открытую пробирку с культурой бактерий ввести бактериологическую петлю и охладить ее, прикоснувшись к внутренней стенке пробирки. Затем осторожно захватить часть микробного налета и

быстро перенести его в другую пробирку со свежей стерильной средой.

7. Петлю опустить до дна пробирки в конденсационную жидкость скошенного мясопептонного агара и сделать посев культуры по поверхности агара штрихом, т.е. зигзагообразными движениями петли, свободно скользя по поверхности среды, не травмируя ее.

8. Вынуть бактериологическую петлю, прокалить над пламенем и поставить в штатив. Обжечь края пробирок и закрыть их пробками, фламбируя, т.е. обжигая поверхность пробки в пламени.

9. На пробирке карандашом по стеклу надписывают дату посева, другие необходимые данные (одновременно их регистрируют в тетради или журнале) о проведенном посеве культуры.

10. Протереть руки и поверхность стола дезинфицирующим раствором.

Посев можно производить уколом по центру среды или уколом по стенке.

Посев уколом по центру проводят бактериологической иглой путем прокалывания столбика агара в средней части, следя затем, чтобы игла нигде не подходила к стенкам пробирки. Не доводя сантиметр до дна пробирки, иглу извлекают, обжигают на пламени спиртовки до красного каления, после чего край пробирки еще раз обжигают, проводят через пламя пробку и закрывают пробирку. Для *посева по стенке* материал вводят иглой пристеночно в столбик МПА.

При *глубинном посеве* стерильную питательную среду расплавляют на кипящей водяной бане, затем охлаждают до температуры 40-45⁰С и заливают предварительно внесенный на дно чашки Петри посевной материал примерно 10 мл среды. Внесенная среда равномерно перемешивается с посевным материалом путем осторожного вращения или покачивания чашки на ровной поверхности стола. Чашку оставляют на столе до полного застывания среды. На крышке делают соответствующую надпись. Глубинный посев применяют для учета микроорганизмов в посевах смывов с различных объектов: сырья, пищевых продуктов, оборудования и т.п. Микробные клетки при глубинном посеве попадают на дно чашки под слой агара, а также на его поверхность. Из клеток образуются колонии разной формы, размера, окраски и т.п., которые затем подсчитываются.

При посеве в жидкую среду (МПБ, молоко) бактериологическую петлю с набранным на нее материалом вносят в пробирку с соблюдением всех предосторожностей, описанных выше. Материал тщательно

но эмульгируют в пробирке, смывая его средой. Пробирки держат почти вертикально, чтобы не замочить их.

При посеве пипеткой соблюдают следующую последовательность:

1. Пипетку вынуть за верхний конец из бумаги, в которой она стерилизовалась, и взять средним и большим пальцами правой руки.

2. В левую руку взять пробирку (колбу) с жидкой стерильной средой и пробирку с культурой бактерий в жидкой среде. При этом пробирка со средой должна быть дальше от себя, а пробирка с культурой – ближе к себе. Соблюдая все предосторожности, описанные выше, открыть одновременно обе пробирки, прижимая пробки к ладони мизинцем и безымянными пальцами правой руки.

3. Отобрав часть среды с культурой бактерий, закрыть сосуд пробкой через пламя спиртовки.

4. Взятую пробу перенести в стерильную среду. После этого пипетку погрузить в дезинфицирующий раствор (0,5-3 % раствор хлорамина или 3-5 % раствор фенола), не касаясь ею окружающих предметов.

Пробирки с посевами ставят в термостат и культивируют в течение 16-18 часов при оптимальной для бактерий температуре. Чашки Петри с посевами укладывают в термостат перевернутыми вверх дном во избежание попадания на поверхность конденсационной влаги.

Пересев – это перенос выращенных микроорганизмов в свежую стерильную питательную среду. Пересевы применяются:

а) при выделении чистой культуры того или иного микроорганизма;

б) для освежения старой культуры микроорганизмов.

Количественный учет микроорганизмов

Определение общего числа микроорганизмов на пищевых продуктах и в других объектах, связанных с их производством, имеет чрезвычайно важное значение в практике пищевой промышленности.

Для определения количества микроорганизмов в единице объема или массы продукта наиболее распространенным в практике стандартным методом является чашечный (подсчет колоний на твердых средах). Метод заключается в том, что берут определенную навеску или объем исследуемого вещества (1мл жидкости или 1-10г твердого продукта) и делают смыв в стерильной водопроводной воде (соответ-

ственно в 9 или в 90 мл). Таким образом, получают первое разведение исследуемого вещества 1:10.

Далее осуществляется разбавление путем разбавления смывной жидкости в 100, 1000 и более раз стерильной водопроводной водой. Для этой цели берут несколько пробирок с 9 мл воды в каждой. Стерильной пипеткой вносят 1 мл смывной воды в первую пробирку и тщательно перемешивают. Получают разведение 1:100. Затем другой стерильной пипеткой берут 1 мл из первой пробирки и вносят его во вторую пробирку, хорошо перемешивают, получают разведение 1:1000 и т.д. Из полученных разведений делают посев по 1 мл в стерильные чашки Петри. Внесенный материал заливают соответствующей питательной средой и после застывания чашки Петри помещают для выращивания (глубинный посев).

Выросшие колонии подсчитывают. Условно считают, что каждая колония развилась из одной клетки. Сосчитав количество колоний на чашке, умножают это число на знаменатель разведений и делят на навеску продукта. Таким образом определяют примерное количество микроорганизмов в 1 г или 1 мл исследуемого вещества.

Если на чашке выросло столько колоний, что их трудно подсчитать, то счет можно проводит следующими методами:

По секторам. Дно чашки с наружной стороны расчерчивают карандашом на несколько одинаковых секторов. Затем пересчитывают колонии в 2-3 секторах и среднее число, найденное для одного сектора, умножают на количество секторов;

При помощи счетной пластинки. Счетная стеклянная пластинка разделена на квадраты площадью 1 см^2 . Опрокинутую вверх дном чашку Петри кладут на стеклянную пластинку и считают число колоний в 10 квадратах, расположенных в двух взаимно перпендикулярных направлениях. После того, как подсчитано количество колоний в 10 квадратах, выводят среднее число на один квадрат (1 см^2). Для определения количества колоний на поверхности всей чашки число колоний в 1 см^2 умножают на поверхность всей чашки, равной πr^2 (для чашки диаметром 10 см радиус 5 см) Если в одном квадрате примерно 30 колоний, то на всей чашке будет $30 \times 3,14 \times 52 = 2355$ колоний.

Задание

Провести посев аэробных бактерий на МПА, скошенный и столбиком.

Провести пересев бактерий из жидкой среды в чашки Петри глубинным способом.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Что такое штамм?
2. Что такое чистая культура?
3. Как получают накопительную культуру?
4. Какие существуют методы культивирования микроорганизмов?
5. Что такое посев микроорганизмов «газоном»?
6. Что такое глубинный посев?
7. Как производится количественный учет микроорганизмов?

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 6

Тема: Микробиологическое исследование воды и воздуха.

Цель: Ознакомление с методами бактериологического исследования воды и воздуха.

Оборудование и материалы: термостат, среды МПА и сусло-агар, жидкая среда Булижа (мясная вода – 1 л, пептон – 10 г, маннит – 15 г, хлорид натрия – 5 г, 1% водный раствор нейтральрот, 2 мл, который добавляют после доведения рН среды до 7,0 – 7,2), чашки Петри со средой Эндо, бактериологические петли, спиртовки, чашки Петри, стерильные склянки.

Исследование воды. Степень зараженности воды микроорганизмами имеет важное значение в технологии пищевых производств. Возбудители многих пищевых кишечных заболеваний (дизентерии, брюшного тифа, паратифа и др.) выделяются больными вместе с фекалиями во внешнюю среду и, следовательно, могут попадать в среду открытых водоемов и источников.

Непосредственное определение патогенных микробов в воде в условиях пищевых предприятий и лабораторий, во-первых, не допускается, во-вторых, затруднено, так как многие их виды не поддаются выращиванию на стандартных питательных средах. Поэтому в лабораторной практике присутствие этих микроорганизмов в воде обычно устанавливают косвенным путем, а именно: 1) определяют общее количество микроорганизмов в 1 мл воды; 2) определяют зараженность воды кишечной палочкой (*Escherichia coli*), так как последняя является специфическим представителем кишечной микрофлоры человека.

Обнаружение в воде кишечной палочки указывает на ее фекальное загрязнение и свидетельствует о возможном присутствии в воде возбудителей указанных выше кишечных заболеваний. Таким образом, кишечная палочка играет роль санитарно-показательного микроорганизма при определении доброкачественности питьевой воды, пищевых продуктов, санитарного состояния технологического оборудования. В стандартах предусмотрены предельно допустимые нормы содержания бактерий группы кишечной палочки в воде и продуктах питания.

Кишечная палочка представляет собой не один вид, а объединяет группу сходных между собой бактерий: *Escherichia coli commune*, *Escherichia coli citrovorum*, *Escherichia coli aerogenes*, *Bacterium para-*

coli и др. Основными морфологическими и физиологическими признаками этой группы являются следующие:

- 1) короткие бесспорные палочки, в большинстве своем подвижные, грамотрицательные;
- 2) аэробы и факультативные анаэробы;
- 3) сбраживают сахара: глюкозу, лактозу, маннит (в зависимости от разновидности) при температурах 43-45⁰С в течение 24 часов с образованием кислоты и газа;
- 4) растут на фуксинсульфитном агаре (среда Эндо) в виде темно-красных колоний с металлическим зеленовато-золотистым блеском или красных и розовых колоний с более темным центром.

При санитарно-гигиенической оценке воды важно не только найти в ней кишечную палочку, но и учесть количество этих бактерий. Для учета в воде определяют титр кишечной палочки (*coli*-титр) и индекс (*coli*-индекс).

Коли-титром называется наименьшее количество воды (в мл), в котором обнаружена хотя бы одна кишечная палочка.

Коли-индекс – это число кишечных палочек, найденных в 1 литре исследуемой воды.

По ГОСТ 2874-82 для питьевой воды, прошедшей очистку, коли-титр должен быть не ниже 300, коли-индекс – не более 3, общее количество микроорганизмов – не более 100 в 1 мл воды.

Для исследования набирают воду в стерильную посуду вместимостью 0,5 – 1 л с ватными или притертыми пробками, которые закрывают бумажными колпаками и завязывают у горловины. Пробы хлорированной воды отбирают в склянки, в которые перед стерилизацией в автоклаве вносят 10 мг гипосульфита $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ на 0,5 л воды. При взятии проб воды из водопроводных кранов последние предварительно стерилизуют, обжигая горящим тампоном, смоченным в спирте. Всего воды набирают 350 – 500 см³. Воду необходимо исследовать не позднее чем через 2 часа после взятия.

Определение общего количества микроорганизмов в 1 мл воды

Для определения общего количества микроорганизмов делают глубокий посев 1 мл воды на МПА в чашку Петри. Если вода сильно загрязнена, посев проводят с разведениями. Посевы воды выращивают в термостате при температуре 37⁰С в течение 24-48 ч, после чего подсчитывают количество колоний на чашке. Хорошая питьевая вода содержит в 1 мл до 100 микроорганизмов, сомнительная – от 100 до 500, загрязненная – свыше 500.

Определение титра кишечной палочки методом бродильных проб

Бродильный метод основан на способности кишечной палочки сбраживать сахара с образованием газа и кислот в условиях повышенных температур (43-45⁰С).

Для посева воды используется жидкая среда Булижа (мясная вода – 1 л, пептон – 10 г, маннит – 15 г, хлорид натрия – 5 г, 1 % водный раствор нейтральрот, 2 мл, который добавляют после доведения рН среды до 7,0–7,2). Среда разливается в пробирки с маленькими перевернутыми поплавками или кусочками ваты, погруженными на дно сосуда, и стерилизуется дробно или 30 мин при 0,5 атм в автоклаве.

При исследовании воды открытых водоемов засевают 100,0; 10,0; 1,0; 0,1 см³ воды. При анализе питьевой воды засевают три объема по 100 см³, три объема по 10 см³ и три объема по 1 см³. Для посева берут 1 мл исследуемой воды. Засеянные пробирки ставят на 48 часов в термостат при температуре 43-45⁰С, максимальной для кишечной палочки, но угнетающей развитие большинства других сапрофитных микроорганизмов. При развитии кишечной палочки на среде Булижа отмечают следующее:

- 1) помутнение (развитие бактерий);
- 2) накопление газа в поплавках (сбраживание маннита);
- 3) изменение окраски (кишечная палочка восстанавливает нейтральрот, благодаря чему красная окраска исчезает и среда приобретает соломенно-желтый цвет).

Если газа и мути нет, значит отсутствует фекальное загрязнение. Наличие газа или помутнение или только помутнение указывает на возможность присутствия бактерий группы кишечной палочки.

Посев на среду Эндо. В связи с тем, что в пробах исследуемой воды, а также в смывах с рук работников, смывах с оборудования, сырья, полуфабрикатов, пищевых продуктов могут присутствовать и другие бактерии, сбраживающие маннит с образованием газа, то для точного установления наличия кишечной палочки из забродившей среды Булижа делают пересев на специфическую среду Эндо. Готовая среда в расплавленном состоянии имеет красноватый цвет, застывшая – кремовый.

Пересев производят следующим образом: карандашом по стеклу размечают дно чашки на секторы по числу пробирок, в которых обнаружено помутнение и газообразование. Из каждой пробирки, захватив небольшое количество материала, делают высев с помощью петли в соответствующий сектор на чашку. Посев делают штрихом,

проводя петлей зигзаг по поверхности агара для получения изолированных колоний. Чашки с посевом помещают в термостат при 37⁰С на 24 часа. По истечении срока колонии исследуют.

При развитии на среде Эндо типичная кишечная палочка образует характерные колонии красного цвета с металлическим блеском, иногда темно-красные и розовые с темным центром.

Если бродильная проба на среду Булижа положительная и культура на среде Эндо имеет ярко-красные колонии, можно считать установленным присутствие в исследуемом материале кишечной палочки. Из типичных колоний следует приготовить мазки и окрасить их по Граму. Обнаружение в мазках грамотрицательных палочек подтверждает наличие бактерий кишечной группы. Определение наиболее вероятного числа бактерий группы кишечной палочки в 1 л воды проводят по таблице 1.

Таблица

Определение коли-индекса при исследовании 333 см³ питьевой воды

Количество положительных результатов воды из			Коли-индекс	Предел коли-индекса (дополнительных групп)		Коли-титр
трех флаконов по 100 см ³	трех пробирок по 10 см ³	трех пробирок по 1 см ³		Нижний	Верхний	
1	2	3	4	5	6	7
0	0	0	Менее 3	-	-	Более 333
0	0	1	3	0,5	9	333
0	1	0	3	0,5	13	333
1	0	0	4	0,5	20	250
1	0	1	7	1	21	143
1	1	0	7	1	23	143
1	1	1	1	3	36	91
1	2	0	11	3	36	91
2	0	0	9	1	36	111
2	0	1	14	3	37	72
2	1	0	15	3	44	67
2	1	1	20	7	89	50
2	2	0	21	4	47	48
2	2	1	28	10	140	36
3	0	0	23	4	120	43
3	0	1	39	7	10	26
3	0	2	64	15	370	16
3	1	0	43	7	210	23
3	1	1	75	14	230	13

Окончание табл.

1	2	3	4	5	6	7
3	1	2	120	30	380	8
3	2	0	93	15	380	11
3	2	1	150	30	440	7
3	2	2	210	35	470	5
3	3	0	240	36	1300	4
3	3	1	460	71	2400	2
3	3	2	1100	150	4800	0,9
3	3	3	Более 1100	-	-	Менее 0,9

Исследование микрофлоры воздуха. Воздух не является благоприятной средой для развития микроорганизмов, однако количество их может быть значительно. Содержание микробов в воздухе помещений зависит от разнообразных причин и условий. Особенно сильно воздух загрязняется микроорганизмами при наличии пыли и большого количества людей.

На пищевых производствах приходится считаться с воздухом, как с фактором, обсеменяющим пищевые продукты. Для исследования загрязненности воздуха микроорганизмами предложено несколько методов. Наиболее простым является метод оседания микроорганизмов на поверхности плотной питательной среды (седиментационный метод Коха).

Для выполнения работы берут 2 стерильные чашки Петри, в одну из них наливают 10-15 мл МПА, в другую – соответствующее количество суслового агара. После застывания среды чашки подсушивают в термостате для удаления с поверхности агара влаги.

Закрытые чашки вносят в помещение, где исследуется воздух, ставят их на горизонтальную поверхность, снимают крышки и кладут одним краем на бумагу, а другим – на край открытой чашки. Чашки оставляют открытыми на 5-10 минут, после чего закрывают и ставят перевернутыми в термостат с МПА при температуре 37⁰С на 1-2 суток, а с суловым агаром на 2-3 суток при 30⁰С. Количество выросших колоний характеризует загрязненность воздуха. Для пересчета микроорганизмов на 1 м³ пользуются формулой В.Л. Омелянского, согласно которой в течение 5 мин на площадь 100 см² (плотная питательная среда) оседает столько микробов, сколько их содержится в 10 л воздуха (1/100 м³) при условии, если воздух находится в состоянии покоя. В зависимости от диаметра и площади чашек Петри

были рассчитаны постоянные множители, на которые надо умножать число колоний, выросших на данной чашке.

Диаметр чашки в см	Площадь чашки в см ²	Множитель расчета числа микробов 1 м ³
8	50	100
9	63	80
10	78	60
11	95	50
12	113	45

Например: если на чашке площадью 78 см² выросло 25 колоний, то количество микробов в 1 м³ = 25х60 = 1500.

Полученные результаты характеризуют обсемененность выпадающих капельных частиц, находящихся в воздухе, что дает ориентировочное представление об общей обсемененности воздуха микроорганизмами. Седиментационный метод удобен для практической работы. Им широко пользуются для вычисления степени загрязненности воздуха в различных помещениях, когда ставятся задачи определения общего санитарного состояния или эффективности уборки и вентиляции помещения. Применяя специальные среды этим методом можно установить обсемененность воздуха самыми разнообразными группами и видами микроорганизмов.

Задание 1

1. Определить общее количество микроорганизмов в 1 мл исследуемой воды (подсчет колоний на МПА).
2. Определить титр кишечной палочки в воде методом бродильных проб.

Задание 2

1. Провести посев воздуха в лаборатории и боксе методом оседания на МПА и сусловый агар.
2. Провести количественный (по формуле В.Л. Омелянского) и качественный (микроскопированием) анализ микрофлоры воздуха указанных помещений.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Что такое коли-титр воды?
2. Что такое микробное число воды?

3. Что такое коли-индекс воды?
4. Какое значение имеет обнаружение в воде кишечных палочек?
5. Как определить микробное число воды?
6. Какое значение имеет обнаружение кишечной палочки на руках людей?
7. Какое значение имеет обнаружение кишечной палочки на оборудовании?
8. Как проводят обследование рук персонала?
9. Как отбирается проба для исследования воды?
10. Как установить коли-титр воды методом бродильной пробы?

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ №7

Тема: Изучение микрофлоры зерна, муки и комбикормов.

Цель: Ознакомление с методами бактериологического исследования зерна, муки и комбикормов.

Оборудование и материалы: термостат, исследуемые образцы пшеницы, ржи, овса, ячменя или других крупнозерновых культур, сусло-агар, агар Чапека в чашках Петри, этиловый спирт, пинцеты, чашки Петри, спиртовки, фильтровальная бумага.

Задание 1

Определить количественный и качественный состав микрофлоры зерна, муки и комбикормов методом смыва.

Сделать посев с указанных продуктов. Посев выращивают в термостате в течение 2-4 суток при 25-30⁰С.

Провести количественный учет и качественный групповой анализ микрофлоры зерна, муки, комбикормов.

Для этой цели:

определить общее количество бактерий в 1 г продукта, для чего подсчитать каким-либо из описанных методов число колоний на чашке Петри в МПА. Умножить число колоний на степень разведения, которое было взято при посеве, и разделить полученное число на количество грамм навески. Подсчитать таким же образом на суслевом агаре или агаре Чапека число грибов в 1 г продукта. Выбрать 2-3 колонии бактерий и грибов, преобладающих на соответствующих питательных средах, описать характерные признаки их роста на питательной среде и приготовить из них препараты для микроскопирования с целью определения морфологических признаков.

Сделать с препаратов соответствующие зарисовки.

Задание 2

Определение степени зараженности зерна внутренней микрофлорой – прямой посев.

Учитывая, что мицелиальные грибы не только обитают на поверхности зерна, но и постоянно внедряются в его внутренние ткани, в результате чего снижается качество зерна и, в первую очередь, его семенные показатели, студенты на лабораторных занятиях должны освоить технику анализа зерна на зараженность его внутренней микрофлорой (прямой посев). Одновременно определяется процент всхожести исследуемого зерна.

Методика прямого посева

1. Разлить в стерильные чашки Петри по 10 мл заранее подготовленной расплавленной среды Чапека (агар Чапека).

2. Отобрать сухим шпателем на чистом листе бумаги от исследуемых образцов пшеницы, ржи, овса, ячменя или других крупнозерновых культур по 50 шт. зерна однородного по внешнему виду.

3. Поместить отобранное зерно в нижнюю часть стерильной чашки Петри и смочить 3-5 мл этилового спирта. Поджечь спирт и, перемешивая зерно стерильным пинцетом в течение нескольких секунд, закрыть крышкой эту чашку.

4. Продезинфицированное описанным способом зерно стерильным пинцетом раскладывают равномерно по поверхности застывшей среды Чапека. Зерно должно находиться не ближе 1-1,5 см друг от друга и от бортов чашки. На каждую чашку укладываются (в зависимости от размеров зерна) от 10 до 20 шт. Свежеубранное зерно, отобранное при уборке в чистые пакеты, можно не подвергать дезинфекции.

5. Чашки с посевами зерна помещают в термостат с $t = 28-30^{\circ}\text{C}$ на 4-5 суток.

6. После проращивания в термостате определяют процент всхожести, процент зараженности зерна внутренней микрофлорой на 100 шт. и групповой состав грибов (полевые грибы или плесени хранения).

На зерне, взятом из колоса или из-под комбайна в период уборки, а также сразу после своевременной и эффективной сушки, будут выявляться преимущественно полевые грибы.

При анализах зерна, доставленного с хлебоприемных предприятий, элеваторов и комбикормовых заводов, очень часто и среди внутренней микрофлоры будут выявляться плесени хранения – разные виды грибов *Aspergillus*, *Penillium*.

Приемы микроскопирования указанных грибов описаны выше.

Задание 3

На основании характера преобладающей микрофлоры сделать ориентировочную оценку качества зерна, муки, комбикормов и условий их хранения.

При выполнении задания следует помнить, что:

выявление в посевах смыва с зерна подавляющего количества травяной палочки, а в прямом посеве – полевых грибов (за исключением *Fusarium*), свидетельствует о свежести и относительной добро-

качественности исследуемого зерна. Преобладание в составе микрофлоры зерна, муки, комбикормов грибов рода *Aspergillus*, *Penillium* в некоторых других (плесени хранения) служит показателем ухудшения качества названных продуктов и свидетельствует о нарушениях условий их хранения (повышения влажности, температуры, признаки самосогревания и т.д.).

Если при анализах микрофлоры в значительном количестве выявляются дрожжи, дрожжеподобные грибы или актиномицеты – это свидетельствует о том, что продукты с повышенной влажностью хранились в условиях недостатка воздуха.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Как определяется количественный и качественный состав микрофлоры зерна, муки?
2. Как определяется степень заражения зерна внутренней микрофлорой?
3. По каким показателям судят о доброкачественности зерна?
4. Какие факторы оказывают влияние на качество зерна и муки?
5. По каким показателям определяют грибную инфекцию?
6. Что значит, самосогревание зерна и о чем это свидетельствует?
7. Расскажите о характерных признаках грибов?
8. Что значит метод прямого посева?
9. Где и при какой температуре выращивают грибы?
10. Как определяется процент всхожести зерна?

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 8

Тема: Микрофлора хлебобулочных, макаронных, кондитерских изделий.

Цель: Ознакомление с методами бактериологического контроля хлебобулочных, макаронных, кондитерских изделий.

Оборудование и материалы: термостат, водяная баня, среда 50% МПА + 50% сусло-агара в чашках Петри, колбы с 90 мл стерильной водопроводной воды, пробирки по 9 мл воды в каждой (для разведений), чашки Петри, пипетки с отпиленным концом.

«Тягучая» болезнь хлеба

Болезнями хлеба называют различные изменения в хлебе, вызываемые деятельностью микроорганизмов. Такие изменения снижают его качество, а иногда делают негодным к употреблению в пищу.

Наиболее известна «тягучая» болезнь хлеба. Она поражает мякиш пшеничного хлеба, который с развитием болезни становится ослизлым, иногда при разломе наблюдается появление тянущихся серебристых нитей. Мякиш окрашивается в коричневый или желто-голубой цвет, поры теряют структуру, запах усиливается и приобретает гнилостный характер. В пораженном хлебе разрушаются основные питательные вещества – белки и углеводы. Белковые вещества теста (клейковина) под действием протеолитических ферментов, выделяемых возбудителями болезни, переходят в более простые соединения. Структура хлеба разрушается в результате способности этих организмов выделять амилолитические ферменты, которые гидролизуют крахмал до декстринов и сахаров. Эти продукты гидролиза образуют специфическую для болезни клейкую массу (отсюда – «тягучая» болезнь хлеба).

При микробиологическом исследовании зараженного хлеба в мякише, как правило, обнаруживается большое количество спорообразующих палочек, относящихся к виду *Bac. mesentericus – Subtilis*. Отсюда происходит другое название – картофельная болезнь хлеба. Картофельно-сенная бацилла является типичным представителем гнилостной группы бактерий, широко распространенных в природе, постоянно встречается в почве, откуда попадает на картофель, зерно и др. Оптимальная температура развития 35-40⁰С.

Вследствие термоустойчивости споры легко сохраняют жизнеспособность в процессе выпечки, так как температура в мякише достигает 98-100⁰С лишь на последних ее минутах.

Основным источником попадания спор в муку, а следовательно и в хлеб, является зерно, подвергшееся самосогреванию. При помоле зерна в муку может попасть разное количество спор бацилл (в зависимости от исходного качества зерна, способов его очистки перед помолом, технологии помола и т.д.).

На основе многочисленных опытов, проведенных по определению обсемененности муки спорами бацилл группы картофельной палочки, предложены следующие примерные нормы: до 200 спор на 1 кг муки – нормальная обсемененность, от 200 до 1000 спор – повышенная обсемененность, более 1000 спор – высокая обсемененность.

Определение относительной степени зараженности муки спорами картофельно-сенной бациллы и близких к ней форм может иметь практическое значение при сравнительных анализах разных партий муки.

Такая мука не должна идти на приготовление мучнистых кондитерских, а также макаронных изделий.

Перед подготовкой к выпечке хлебобулочных изделий необходимо проверить муку на обсемененность спорами бацилл путем пробных выпечек. Если хлеб остается без видимых изменений через 24 часа при температуре 37⁰С, то практически установлено, что он не подвергается порче при комнатной температуре в течение трех суток. В случае порчи пробного хлебца через 24 часа мука допускается в производство с определенными ограничениями с подсортировкой в небольшом количестве к доброкачественной муке.

Гнилостная группа бацилл очень чувствительная к реакции среды. При оптимальном значении рН 6,5-7,5 развитие бацилл приостанавливается, а при рН 4,7 – прекращается. Поэтому одной из действенных мер для предупреждения развития этих бацилл является повышение кислотности теста.

В настоящее время наиболее эффективным способом является приготовление пшеничного теста на «жидких дрожжах», которые представляют смесь молочнокислых бактерий с дрожжами рода сахаромицетов.

При отсутствии цеха «жидких дрожжей» в настоящее время для выпечки булочных изделий применяют молочную сыворотку или подкисляют тесто молочной, лимонной, пропионовой кислотой.

В случае заболевания хлеба необходимо провести тщательную обработку всей линии раствором уксусной кислоты.

Задание 1

Определение количества спор гнилостных бацилл.

При посеве муки на питательную среду в данной работе важно выявить лишь число спор бактерий группы картофельно-сенной палочки, так как вегетативные клетки этих бактерий погибают при выпечке хлеба.

Для выполнения работы необходимо иметь одну колбу с 90 мл стерильной водопроводной воды, 2 пробирки по 9 мл воды в каждой (для разведений), чашки Петри и одну 1-миллиметровую пипетку с отпиленным концом.

Порядок выполнения работы

1. 10 г пшеничной муки вносят в колбу с 90 мл стерильной воды. Навеска муки в воде встряхивается в течение 5 мин. Целесообразно перед стерилизацией воды положить в нее немного стеклянных бус, с помощью которых бактерии легче отмываются с частиц муки при встряхивании.

2. Полученная взвесь муки в воде пастеризуется на водяной бане при температуре 75°C в течение 10 мин. Началом пастеризации считается момент достижения пастеризуемой известью температуры 75°C . Для контроля температуры в водяную баню наряду с опытными колбами ставят контрольную с таким же количеством воды и муки, снабженную термометром. При прогревании по указанному режиму в пастеризуемом материале отмирают все вегетативные клетки бактерий, мицелиальные грибы и дрожжи.

3. После прогрева колба немедленно охлаждается струей водопроводной воды и из нее делают высев 1 мл взвеси с дополнительным разведением 1:100 и 1:1000 на питательную среду (50% МПА + 50% сусло-агар) в чашки Петри глубинным способом. На указанной среде лучше всего различается видовой состав бацилл по внешнему виду их колоний.

4. Посевы на чашках выдерживаются в термостате при 35°C в течение 2-3 суток, после чего подсчитываются выросшие колонии, характерные для групп картофельно-сенной бациллы.

5. Проводится микроскопирование, отмечается характерная особенность бацилл.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Как формируется микрофлора хлеба?
2. Какие микроорганизмы присутствуют в зерне и муке?
3. Какие микроорганизмы используют для разрыхления теста?
4. Что такое закваска, и какие микроорганизмы используются в качестве закваски?
5. Какие микроорганизмы вызывают «Тягучую болезнь» хлеба?
6. Какие микроорганизмы вызывают плесневение хлеба?
7. Какие микроорганизмы вызывают меловую болезнь хлеба?
8. Какую роль выполняют молочнокислые бактерии при хлебопечении?
9. Что такое титр сложных бактерий в муке?
10. По каким показателям оценивают санитарно-гигиенические условия хранения и транспортировку хлебобулочных изделий?

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 9

Тема: Возбудители порчи пищевых продуктов.

Цель: Ознакомление с морфологией, культуральными и биохимическими свойствами некоторых возбудителей порчи пищевых продуктов.

Оборудование и материалы: культуры возбудителей порчи пищевых продуктов, выращенных на МПА, МПБ, молоке; микроскопы, предметные стекла, бактериологические петли, набор красок для окраски бактерий по Граму, иммерсионное масло, спиртовки.

Порчу пищевых продуктов животного происхождения вызывают гнилостные бактерии, микрококки, энтерококки, микроскопические грибы, дрожжи, актиномицеты, возбудители некоторых видов брожений (маслянокислые, уксуснокислые и др.).

Спорообразующие аэробы. Эта группа гнилостных бактерий представлена палочковидными микробами, вызывающими порчу продуктов при хранении их в аэробных условиях: *Bacillus subtilis* (сенная палочка), *Bac. megatherium* (капустная палочка), *Bac. mycoides* (грибовидная палочка), *Bac. mesentericus* (картофельная палочка).

Крупные палочки размером от 3 до 6 мкм, споры расположены в центре клетки, подвижные, капсул не образуют, по Граму красятся положительно. В мазках, приготовленных из культуры бактерий, палочки расположены по 1-2 особи или формируют цепочки.

Строгие аэробы культивируются на простых питательных средах: МПБ, МПА, рН среды 7,2-7,6.

На МПБ *Bac. subtilis*, *Bac. mycoides*, *Bac. cereus* формируют на поверхности среды беловатого цвета пленку, бульон остается прозрачным. Другие аэробные бактерии вызывают помутнение бульона различной степени.

На МПА *Bac. cereus* образует среднего размера колонии серовато-белого цвета со складчатым центром и изрезанными краями. *Bac. mycoides* вырастает на плотной питательной среде в виде очень крупных колоний с многочисленными отростками, напоминающими мицелий гриба. *Bac. megatherium* на мясопептонном агаре формирует гладкие блестящие, матового цвета, колонии с ровными краями. Другие гнилостные аэробные бациллы на плотной среде образуют сероватого цвета колонии с лопастными (*Bac. Subtilis*) или волнистыми

(*Bac. mesentericus*) краями, с радиальной складкой, отходящей от центра колонии.

Гнилостные аэробы обладают протеолитической способностью, выделяют ферменты из группы протеаз, разлагают белки с выделением дурнопахнущих веществ. Бактерии разжижают желатин, свертывают и пептонизируют молоко.

Неспорообразующие аэробы. Порчу продуктов вызывают бактерии из рода *Pseudomonas* *Ps. fluorescens* — флюоресцирующая палочка, *Ps. aeruginosa* — синегнойная палочка, *Serratia marcescens* — чудесная палочка.

Бактерии представляют собой мелкие палочки, не образующие спор и капсул, подвижные, по Граму красятся отрицательно.

На МПБ они вызывают помутнение бульона с образованием пигмента, характерного для каждого вида: чудесная палочка окрашивает среду в красный цвет, синегнойная — в сине-зеленый, флюоресцирующая — в зеленовато-желтый. На МПА формируют круглые, с ровными краями колонии.

Группа неспорообразующих пигментных аэробов обладают протеолитическими свойствами, разжижает желатин, свертывает и пептонизируют молоко, образует аммиак, иногда — сероводород.

Спорообразующие анаэробы. Из анаэробов наиболее часто порчу пищевых продуктов животного происхождения вызывают бактерии из рода *Clostridium* . *Cl. sporogenes*, *Cl. putrificum*.

Бактерии крупных размеров, палочковидной формы образуют споры, превышающие диаметр вегетативной клетки, подвижны, капсул не образуют, по Граму красятся положительно.

Микробы культивируются в анаэробных условиях. *Cl. putrificum* на среде Цейслера образует колонии в виде клубка волос с зоной гемолиза *Cl. sporogenes*, растет на плотной среде, образуя мелкие прозрачные колонии. Анаэробы вызывают помутнение среды Китта-Тароцци.

Анаэробы обладают выраженными протеолитическими свойствами. Они разжижают желатин, свертывают и пептонизируют молоко, вызывают почернение мозговой среды, образуют сероводород, аммиак, индол. Бактерии могут разлагать жиры.

Порчу пищевых продуктов могут вызывать факультативно-анаэробные бесспорные бактерии рода *Proteus*, *Escherlchia*, микроскопические грибы, дрожжи, актиномицеты. Характеристика этих микроорганизмов дана на предыдущих занятиях

Энтерококки. Порчу пищевых продуктов могут вызывать стрептококки кишечного происхождения (энтерококки). К ним относятся: *Str. liquefaciens* (*Mammococcus*), *Str. faecalis*, *Str. faecium*, *Str. zymogenes*, *Str. bovis*.

Бактерии шаровидной формы образуют короткую цепочку или располагаются попарно, неподвижны, спор и капсул не образуют, по Граму красятся положительно.

Энтерококки могут развиваться как при низкой (10°C), так и при высокой (45 °C) температуре, обладают устойчивостью к хлориду натрия (6,5%), щелочной реакции (рН 9,6), метиленовой сини, желчи (40%), к пенициллину, являются термоустойчивыми, температуру 65 °C выдерживают в течение 30 мин. Отдельные виды энтерококков отличаются по ряду культуральных и ферментативных свойств.

Str. liquefaciens (маммококк) при культивировании на молоке разлагает лактозу, образует молочную кислоту, выделяет сычужный фермент. В результате воздействия молочной кислоты и сычужного фермента наступает свертывание молока при пониженной кислотности (при 35. ..40°Т вместо 60 °Т). Сгусток молока вначале ровный, затем под влиянием сычужного фермента наступает пептонизация казеина, выделяется большое количество сыворотки. *Str. liquefaciens* сбраживает сорбит и разлагает глицерин, разжижает желатин. Молочнокислые продукты при размножении в них маммококков приобретают горький вкус в результате накопления значительного количества пептонов.

Str. bovis в отличие от других энтерококков обладает чувствительностью к желчи, поваренной соли, щелочной среде и метиленовой сини, термоустойчив, не культивируется при 10°C, свертывает молоко, частично восстанавливает лакмусовое молоко, не разлагает глицерин.

Маслянокислые бактерии. К маслянокислым бактериям относятся *Cl. butyricum*, *Cl. pasteurianum* и др.

Бактерии крупных размеров, палочковидной формы, образуют споры, которые располагаются в центре клетки или субтерминально, споры превышают диаметр вегетативной формы клетки. Палочки подвижны, грамположительны, капсул не образуют.

Маслянокислые бактерии являются облигатными анаэробами, культивируются на среде Китта-Тароцци, вызывают помутнение среды с обильным образованием газа и запаха масляной кислоты. На среде, содержащей сырой картофель, мел, водопроводную воду, через

2-3 дня культивирования при 35 °С возбудитель обильно выделяет газ, в цитоплазме клетки накапливается гранулеза, которую выявляют путем микроскопии препаратом «раздавленная капля» при добавлении в нее раствора Люголя. В препарате легко обнаруживаются крупные булавовидной формы маслянокислые бактерии с неокрашенными спорами, а в цитоплазме — зерна гранулезы, окрашенные йодом в синий цвет.

Маслянокислые бактерии термоустойчивы, являются возбудителями порчи различных консервов (мясных, рыбных, овощных) и молочных продуктов (сыра, творога, сливок и др.) при их длительном хранении.

Уксуснокислые бактерии. Уксуснокислые бактерии относятся к роду *Acetobacter*, включающему несколько видов: *A. aceti*, *A. orleans* и др.

Acetobacter aceti палочковидной формы, неподвижные, спор и капсул не образуют, располагаются цепочкой, грамотрицательные.

Уксуснокислые бактерии являются аэробами, на поверхности жидких питательных сред образуют пленку. Оптимальная температура для большинства различных видов находится в пределах 25-30°С. В среде накапливается большое количество уксусной кислоты. Уксуснокислые бактерии вызывают кислотное брожение, приводящее к порче полуфабрикатов и готового сырья.

Задание

Изучить морфологические свойства возбудителей порчи пищевых продуктов. Приготовить препараты из культур бактерий, выращенных на питательных средах, окрасить по методу Грама, микрокартину зарисовать. Ознакомиться с культуральными свойствами возбудителей порчи пищевых продуктов, выращенных на плотных и жидких питательных средах.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. По каким признакам определяют видовую принадлежность микроорганизмов?
2. Назовите и охарактеризуйте группу спорообразующих аэробов, вызывающих порчу продуктов при хранении.
3. Какие неспорообразующие аэробы вызывают порчу продуктов?

4. Какие спорообразующие аэробы вызывают порчу продуктов животного происхождения?

5. Назовите и охарактеризуйте группу кокковых микроорганизмов, вызывающих порчу продуктов.

6. Расскажите о маслянокислых бактериях и их роли в порче различных консервированных продуктов.

7. Роль уксуснокислых бактерий в порче полуфабрикатов и готового сырья.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 10

Тема: Микробиологическое исследование консервов.

Цель: Ознакомление с методами микробиологического исследования консервов до и после стерилизации. Самостоятельное проведение микробиологического исследования консервов после стерилизации.

Оборудование и материалы: консервы (говяжья или свиная тушенка), спирт, пробойник, стерильные чашки Петри, ватные тампоны, стеклянные стерильные трубки, пинцеты, МПБ, среда Китт-Тароцци, водяная баня с термометром, микроскопы, реактивы и набор красок для окрашивания по Граму, предметные стекла, стерильная вода в колбах.

Бактериологическое исследование консервов до стерилизации. Проверка бактериальной обсемененности содержимого консервных банок перед стерилизацией проводится немедленно после закатки банок.

Для бактериологического исследования консервов до стерилизации отбирают 3 образца (банки) сразу после закатки. Банки тщательно моют теплой водой и вытирают. Затем крышку банки, смоченную спиртом, фламбируют. Открывают банки стерильным пробойником.

Пробы для анализа содержимого банок отбирают в зависимости от вида и консистенции продукта. Если консервы содержат большое количество заливки или бульона, то для посева берут непосредственно жидкую часть продукта. Если консервы не содержат жидкой фазы или содержат ее в незначительном количестве, то в продукт добавляют стерильную воду в соотношении 1 : 1 и высевают смыв с продукта или без дальнейшего разбавления, или из последовательно приготовленных при разведении. Для этого при фасовании в тару вместимостью до 0,5 л содержимое банки перекладывают в стерильную банку (вместимостью 1,5-2л) с таким же содержанием воды, закрывают крышкой и встряхивают в течение 3 мин, после чего отбирают пробу для посева. В зависимости от предполагаемого микробного обсеменения сырья пробу разводят с таким расчетом, чтобы на чашке с питательной средой выросло не более 300 колоний.

Бактериологическое исследование банок перед стерилизацией включает определение общего количества микроорганизмов в содержимом банок, выявление спор облигатных анаэробов, выявление спор

термофильных бактерий (возбудителей плоскокислой порчи; проводится только для консервов, содержащих неокисленные продукты, такие, как зеленый горошек, фасоль, кукурузу).

Определение общего количества микроорганизмов проводится ежедневно, один раз в каждую смену на каждой линии и по каждому виду вырабатываемой продукции.

Общее количество микроорганизмов в каждом образце перед стерилизацией не должно превышать в 1 г продукта следующих значений:

мясо тушеное – 200 тыс микробных клеток;

мясо-растительные и сало-бобовые при закладке мяса и фарша с предварительной тепловой обработкой – 20 тыс микробных клеток;

мясо-растительные при закладке сырого мяса и фарша – 50 тыс микробных клеток;

паштет мясной и печеночный – 10 тыс микробных клеток. Для определения общего количества микробов в исследуемой пробе консервов делают посев 1 см^3 (г) продукта или его разведение в чашки Петри с МПА. Через сутки культивирования посевов при температуре 37°C подсчитывают количество колоний, выросших на чашке, и определяют общую микробную обсемененность по формуле:

- при посеве непосредственного продукта

$$x = a/q;$$

- при посеве смыва продукта

$$x = (a \cdot 10^n \cdot V_{\text{вод}}) / (V_{\text{прод}} \cdot q),$$

где x — количество микробов в 1 см^3 (г) продукта, a — число колоний, выросших на чашке, n — степень разведения продукта; $V_{\text{вод}}$ — объем воды в банке; $V_{\text{прод}}$ — объем продукта в банке; q — объем посевного материала, внесенного в чашку.

Определение спор облигатных анаэробов в содержимом консервных банок перед стерилизацией проводят:

- с профилактической целью – 1-2 раза в неделю по каждому виду вырабатываемой продукции;

- немедленно (на следующий день) после установления повышенной бактериальной обсемененности консервируемого продукта перед стерилизацией.

При удовлетворительном санитарном состоянии технологических линий в содержимом консервных банок перед стерилизацией не должны обнаруживаться споры облигатных анаэробов.

Для выявления анаэробов из подготовленного для анализа образца стерильной трубкой или пипеткой отбирают примерно 10 см³ продукта и вносят в стерильную пробирку. Пробирку с отобраным продуктом прогревают в кипящей водяной бане (после достижения 94-96°C внутри пробирки) в течение 20 мин. После охлаждения 0,5 см³ прогретого продукта засеивается в пробирку с накопительной средой Китта-Тароцци. Посевы термостатируют при температуре 37°C, спустя 48 ч после посева в среде отмечают газообразование и анаэробный рост. При наличии анаэробного роста из накопительных посевов 1-2 капли высеивают в чашки Петри. Чашку Петри заливают 30 см³ расплавленного МПА с 1%-й глюкозой. Сразу же после застывания агара на его поверхность пинцетом кладут стерильное предметное стекло так, чтобы под ним не было пузырьков воздуха. Затем чашку переворачивают крышкой вниз и ставят в термостат с температурой 37°C.

Рост облигатных анаэробов выявляется на чашке под стеклом в центральной его части в виде отдельных колоний или сплошного роста на расстоянии 3-4 мм от края стекла, образуя иногда под стеклом пузырьки газа.

Факультативные анаэробы растут не только под стеклом, но и по всей поверхности среды в чашке.

Выявление спор термофильных бактерий проводят следующим образом: из предварительно прогретой пробы отбирают 5 см³ взвеси и вносят в 25 см³ МПА с 1 % глюкозы и 0,004% бромкрезолпурпура (среда должна иметь слабо-фиолетовую окраску). Посевы помещают в термостат при температуре 55 °C на 24-48 ч. Изменение окраски среды от фиолетовой до желтой или появление желтых ореолов вокруг колоний свидетельствует о наличии в исследуемой пробе термофильных бактерий.

Возбудителями плоскокислой порчи являются термофильные спорообразующие аэробные микроорганизмы: *Bac. stearothermophilus*, *Bac. aerothermophilus*, *Bac. coagulans* и др.

Термофильные микроорганизмы, размножаясь в продукте в условиях хранения при повышенных температурах (40-70°C), могут разлагать углеводы с образованием органических кислот без выделения газа, не вызывают бомбажа банок, но продукт приобретает кислый запах и неприятный кислый вкус.

Бактериологическое исследование консервов после стерилизации. Готовые консервы после стерилизации подвергают бактериоло-

гическому исследованию в случае: обнаружения в партии повышенной микробной обсемененности или наличия спор облигатных анаэробов в содержимом банок перед стерилизацией; отступления от технологических инструкции при изготовлении данной партии продукта; закладки консервов на длительное хранение; изготовления консервов на экспорт; отсутствия показателя допустимой бактериальной обсемененности консервов до стерилизации.

Для бактериологического исследования готовой продукции согласно ГОСТ 87560-70 отбирается средняя проба от сменной выработки консервов одного наименования и одного размера тары. При фасовании консервов в жестяную или стеклянную тару вместимостью до 1 л отбирают две банки, которые завертывают в бумагу, опечатывают или пломбируют. Пробы сопровождают актом изъятия проб и этикеткой, на которой указывают наименование предприятия, выработавшего продукт, наименование, сорт и дату выработки продукта, дату отбора пробы, номер ГОСТа или технических условий на данный продукт.

В лаборатории образцы консервов подвергают внешнему осмотру. На анализ отбирают банки без дефектов (бомбаж, следы подтеков и т.д.). Банки тщательно моют, вытирают полотенцем и проверяют на герметичность.

Для микробиологического исследования отбирают только герметичные банки. Отобранные консервы подвергают термостатной выдержке.

Для выявления жизнедеятельности мезофильных факультативно-анаэробных и анаэробных микроорганизмов консервы мясные, мясо-растительные, сосиски, ветчину, а также другие консервы с рН более 4,4, термостатируют при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Консервы в таре вместимостью 1 л и менее выдерживают в термостате в течение 5 суток, консервы вместимостью более 1 л – 10 суток.

Для установления стерильности или для выявления жизнедеятельности термофильных аэробных, факультативно-анаэробных и термофильно-анаэробных микроорганизмов овоще-мясные консервы для детского и диетического питания и другие консервы в таре любой вместимости термостатируют в течение 3 суток при $55 \pm 0,5^\circ\text{C}$ непосредственно перед высевом. После термостатирования консервы выдерживают в течение 24 ч при комнатной температуре, после чего отмечают наличие дефектов тары.

Наряду с термостатной выдержкой из консервов, отобранных для анализа, делают высевы на питательные среды, чтобы установить характер остаточной микрофлоры.

Вскрытие банок проводят в специально приспособленном для проведения стерильных работ боксе. Ватным тампоном, смоченным спиртом, протирают крышку банки и фламбируют на пламени. После обжигания острием пробойника прокалывают отверстие в крышке банки. Отверстие должно иметь 1-1,5 см в диаметре. После вскрытия банки пробойник убирают и тотчас же проводят высев содержимого банки на питательные среды. Материал из банки берут стерильной стеклянной трубкой с внутренним диаметром 0,8 см.

Пробу для посева берут почти в пламени горящего кольца. В каждой пробе должно быть немного жидкости (бульона) и плотных кусочков продукта (мяса, фарша и т. д.).

Для выявления мезофильных аэробных микроорганизмов из каждой банки по 2 см³ высевают в две пробирки МПБ с глюкозой. Посевы инкубируют в термостате с температурой 37°C в течение 5 сут с ежедневным просмотром.

Для выявления анаэробов посев проводят в две пробирки со средой Китта-Тароцци. Перед посевом для удаления растворенного кислорода среду регенерируют нагреванием, затем стеклянной трубкой в каждую пробирку вносят 2 см³ содержимого банки. Засеянные пробирки выдерживают при температуре 37°C 5 суток, ежедневно контролируя появление роста культур.

Для выявления возбудителей ботулизма пробу консервированного продукта не менее 30 см³ или 2 см³ жидкости высевают в четыре флакона с регенерированной средой Китта-Тароцци. При этом проводят обработку посевов. Один флакон прогревают при 80 °C в течение 30 мин, второй оставляют без прогрева и термостатируют при 37°C. Третий флакон с посевом прогревают при 60 °C в течение 15 мин, а четвертый не прогревают. Посевы термостатируют при температуре 30°C. За посевами наблюдают в течение 10 суток.

Учет результатов исследования

При появлении признаков роста аэробных микроорганизмов (помутнение МПБ, образование пристеночного кольца или пленки и осадка) готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Если в мазках обнаруживают крупные грамположительные палочки или кокки, проводят высев на МПА. Выросшие затем на МПА микробные

колонии подвергают дальнейшему изучению для идентификации микроорганизмов.

При выявлении в мазках мелких грамотрицательных неспорообразующих палочек из посевов делают высевы на среду Эндо, скошенный агар по Щукевичу и на МПА с 1 % глюкозы, ставят каталазную пробу.

Выявление анаэробов: мезофильные анаэробные микробы вызывают помутнение среды с выделением газа, в результате чего появляется посторонний запах, иногда разлагаются кусочки печени.

При наличии роста микробов материал берут пастеровской пипеткой, готовят мазки и окрашивают по Граму. В мазках, содержащих облигатно-анаэробные бактерии, обнаруживают грамположительные спорообразующие палочки.

Для подтверждения принадлежности выявленных спорообразующих микроорганизмов к мезофильным облигатным анаэробам из рода *Clostridium* проверяют отсутствие у них каталазы. Если каталаза не выявлена, то считают, что в посевах присутствуют мезофильные облигатно-анаэробные микробы из рода *Clostridium*.

Выявление возбудителя ботулизма: при обнаружении признаков роста микроорганизмов на среде Китта-Тароцци посевы выдерживают в термостате 6 суток, периодически отбирая из флаконов культуральную жидкость для анализа. Из культуры готовят мазки, окрашивают их по Граму.

При наличии в среде возбудителя ботулизма отмечают помутнение среды, газообразование, маслянокислый запах. В мазках, окрашенных по Граму, обнаруживают грамположительные крупные палочки со спорами в виде ракеток. Если в консервированном продукте возбудитель находится в вегетативной форме, то видимый рост микроорганизмов можно наблюдать в непрогретых флаконах. Культуральную жидкость исследуют на наличие токсина и установление его типа.

Токсигенные свойства культуры определяют путем постановки биопробы на белых мышах.

В случае выявления *Cl. botulinum* данная партия консервов считается непригодной в пищу, на что выдается заключение санитарно-эпидемиологической службы с предписанием об уничтожении. При выявлении клостридий других видов вопрос об использовании данной партии консервов решают местные органы санитарно-эпидемиологической службы.

Задание

Ознакомиться с методами отбора проб для микробиологического исследования консервов. Ознакомиться с методикой микробиологического исследования консервов до стерилизации и после стерилизации. Провести посев на питательные среды из образцов мясных консервов после стерилизации в соответствии с ГОСТом. Провести учет результатов исследования.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Какое значение имеет степень обсеменения микроорганизмами исходного сырья при консервировании?
2. Как осуществляются бактериологические исследования консервов до стерилизации?
3. Как осуществляется бактериологический контроль банок перед стерилизацией?
4. Как определяется общее количество микроорганизмов?
5. Как определяется микробиологическое исследование консервов после стерилизации?
6. Как проводится стерилизация баночных консервов?
7. Какая микрофлора может сохраняться в баночных консервах?
8. Как осуществляется микробиологический контроль при изготовлении консервов?
9. На какие виды микроорганизмов проводится исследование баночных консервов?
10. Что такое бомбаж, виды бомбажа?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №11

Тема: Микробиологический контроль производственной культуры дрожжей в пивоварении.

Цель: Определение физиологического состояния дрожжей методом микроскопирования.

Оборудование и материалы: микроскопы, предметные и покровные стекла, камера Горяева, раствор метиленового синего(1:5000), 0,5%-й раствор йода (0,5 г йода и 1 г КJ на 100 мл воды), культуры дрожжей.

Производственные культуры дрожжей периодически подвергаются микробиологическому контролю по ряду признаков: морфология клеток, биологическая чистота, содержание мертвых клеток. Дрожжи контролируют и по физиологическому состоянию: наличие в них гликогена, способности к размножению, брожению и оседанию.

Биологическая чистота производственных дрожжей – отсутствие посторонних микроорганизмов – является залогом нормального процесса брожения и получения стойкого продукта. Источниками инфекции производственных дрожжей являются воздух, вода, сырье, оборудование и обслуживающий персонал.

Биологическая чистота определяется микроскопированием не менее 20 полей зрения с содержанием в каждом из них не менее 50 клеток. Таким образом, просматривается примерно 1000 дрожжевых клеток производственной культуры и определяется содержание в них диких дрожжей. Годными считаются производственные дрожжи, содержащие не более 0,5% диких дрожжей.

Дрожжи можно оценивать по следующей шкале:

Число посторонних м/о в 50 полях зрения	Оценка дрожжей
0-2	Очень хорошие
2-4	Хорошие
4-10	Удовлетворительные
10-50	Плохие

Микробиологический анализ не всегда позволяет обнаружить имеющуюся инфекцию, поэтому его дополняют посевами на различные питательные среды.

Жизнеспособность дрожжей определяют по количеству мертвых клеток. Мертвых клеток должно быть не более 10 %. Большое содержание мертвых клеток вызывает замедление брожения, способствует развитию посторонней микрофлоры, автолизу дрожжей. Мертвые клетки определяют микроскопированием препарата со слабым раствором метиленового синего. Количество окрашенных и неокрашенных клеток подсчитывают в 10 полях зрения препарата и определяют процентное содержание мертвых клеток. Мертвые дрожжевые клетки, как более легкие, можно удалить промыванием водой.

Упитанность дрожжей определяют по содержанию в клетках гликогена. Он является запасным питательным веществом, и наличие его дает представление о способности дрожжей к брожению. В нормально упитанных дрожжах 70–75% клеток содержат гликоген. Меньшее количество клеток с гликогеном в производственных дрожжах свидетельствует о старости дрожжевых клеток или о недостаточном их питании. При применении дрожжей с небольшим содержанием гликогена главное брожение удлиняется. Количество гликогена быстро меняется в зависимости от условий хранения дрожжей.

Способность к размножению определяют по наличию почкования. От скорости размножения зависит быстрота накопления биомассы во время брожения. Скорость размножения определяют по времени генерации клеток (периоду удвоения биомассы) и по коэффициенту размножения, представляющему собой отношение количества клеток в последующие сутки к их количеству в предыдущие сутки. Скорость размножения и коэффициент размножения дрожжей определяют подсчетом концентрации клеток в счетной камере Горяева.

Задание 1

Приготовить препарат «раздавленная капля» из осадка дрожжей со дна сброженной жидкости, из бродильных сосудов на разных стадиях брожения (6 – 12 – 24 ч).

Бактериологической петлей берут немного осадка или суспензии и вносят её в каплю водопроводной воды на предметном стекле. Размешав её в равномерную негустую суспензию, накрывают покровным стеклом, на которое помещают каплю иммерсионного масла и микроскопируют с объективом 90X. Сравнить морфологию клеток на разных препаратах. Найти почкующиеся дрожжи. Сделать зарисовки.

Задание 2

Определить биологическую чистоту дрожжей из осадка, просмотрев 10 – 20 полей зрения, содержащих не менее 50 клеток. Сделать зарисовки обнаруженных посторонних микроорганизмов.

Задание 3

Определить жизнеспособность (% мёртвых клеток) дрожжей, находящихся на разных стадиях роста (разведенные сухие дрожжи, прессованные дрожжи, дрожжи в процессе активного роста и брожения, дрожжи в осадке). Окрасить суспензию дрожжей слабым раствором метиленового синего в центрифужной пробирке. Приготовить препарат «раздавленная капля» и просмотреть 5 - 10 полей зрения, подсчитывая число окрашенных и неокрашенных клеток. Общее количество клеток принять за 100 %, число окрашенных – за X. Найти процент мертвых клеток, сравнить и сделать зарисовки.

Задание 4

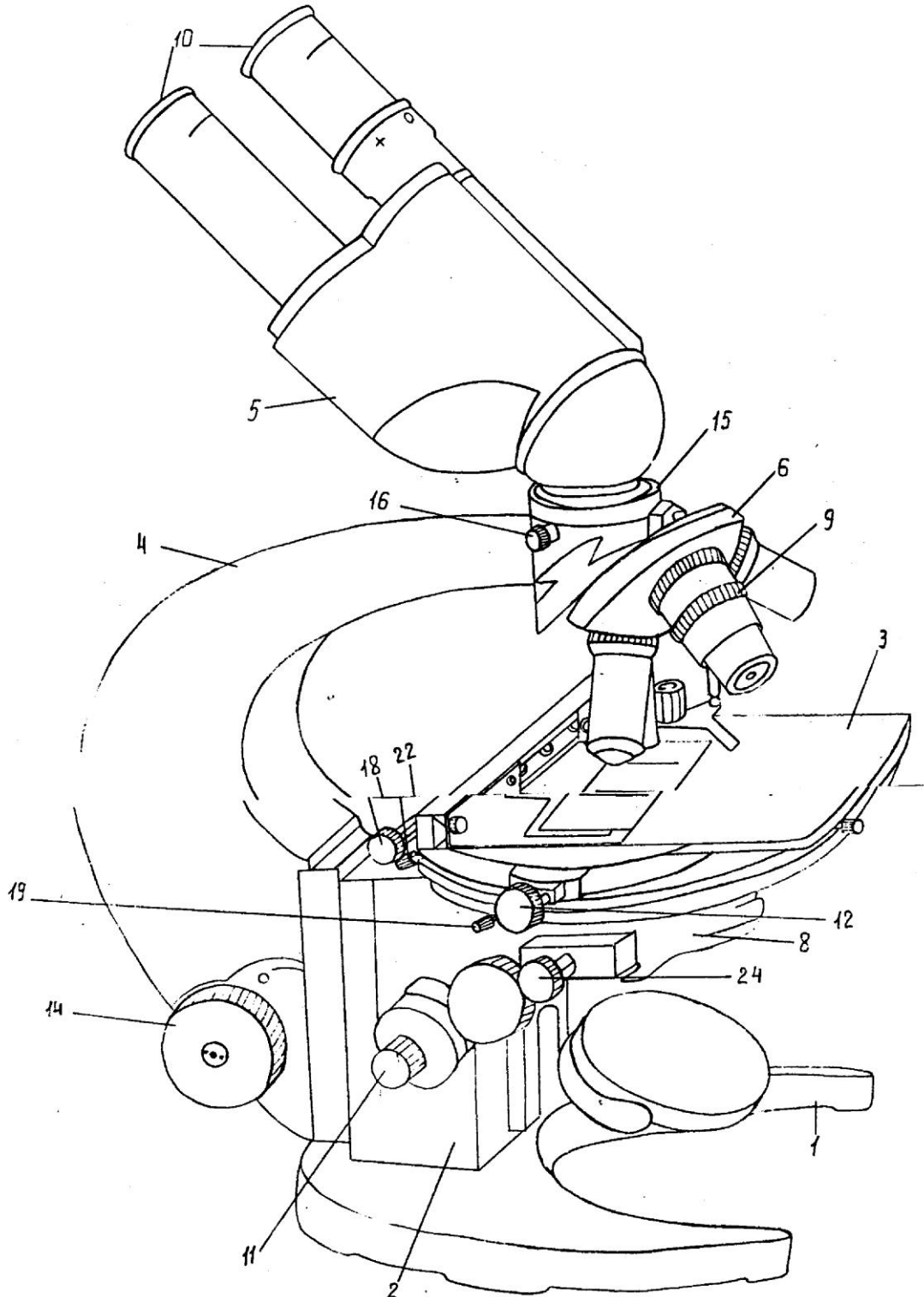
Определить упитанность клеток по содержанию гликогена после окрашивания капли дрожжевой суспензии 2 каплями 0,5%-го раствора йода (0,5 г йода и 1 г КJ на 100 мл воды).

Сделать выводы о физиологическом состоянии производственной культуры дрожжей.

Вопросы для самостоятельного контроля

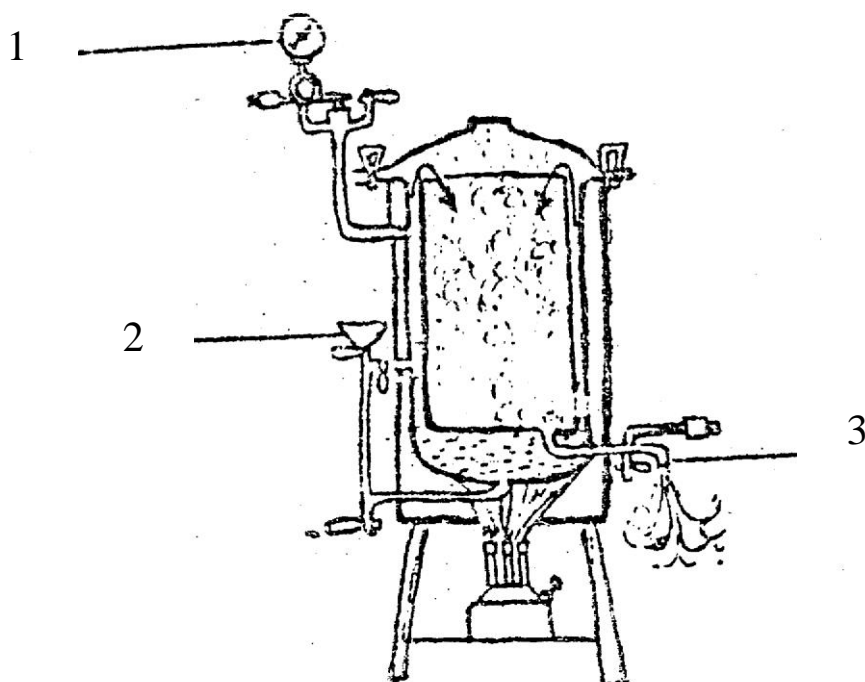
1. Как отличаются дикие дрожжи от культурных?
2. Как определить процент почкующихся клеток?
3. Какие микроорганизмы являются посторонними при микроскопии дрожжей?
4. Как определяется жизнеспособность дрожжей?
5. Как определяется упитанность клеток дрожжей?

ПРИЛОЖЕНИЕ



Микроскоп – МБР-3

1 – основание штатива; 2 – коробка с механизмом; 3 – предметный столик; 4 – тубусодержатель; 5 – бинокулярная насадка; 6 – револьвер объектива; 7 – рукоятка тонкой фокусировки; 8 – рукоятка для перемещения в продольном направлении; 9 – объективы; 10 – рукоятка грубой фокусировки; 11 – головка для крепления револьвера и тубуса; 12 – рукоятка для перемещения в поперечном направлении; 13 – винт для центровки предметного столика;



Автоклав

1 – манометр; 2 – воронка для воды; 3 – кран для выпуска пара

ЛИТЕРАТУРА

1. Нецепляев, С.В. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых продуктов животного происхождения / С.В. Нецепляев, А.Я. Панкратов. – М.: Агропромиздат, 1990. – 223с.

2. Лихтенберг, Л.А. Атлас производственных дрожжей брожения *Saccharomyces cerevisiae* XII расы / Л.А. Лихтенберг, Е.А. Двдцатова, В.С. Чередниченко. – М.: Пищепромиздат, 1999. – 24 с.

3. Клевакин, В.М. Санитарная микробиология / В.М. Клевакин, В.В. Карцев В.В. – Л.: Медицина, 1986. – 176 с.

4. Костенко Ю.Г., Нецепляев С.В., Гончарова Л.А. Основы микробиологии, гигиены и санитарии на предприятиях мясной и птицеперерабатывающей промышленности / Ю.Г. Костенко, С.В. Нецепляев, Л.А. Гончарова. – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1984. – 173с.

5. Руководство к практическим занятиям по микробиологии, иммунологии и вирусологии/ Под ред. М.П. Зыкова. –М.: Медицина, 1977. – 288с.

6. Жвирблянская, А.Ю. Микробиология в пищевой промышленности / А.Ю. Жвирблянская, О.А. Бакушинская. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 501 с.
7. Практикум по микробиологии / Под. ред. Егорова Н.С. – М.: Изд-во МГУ, 1976. – 307с.
8. Промышленная микробиология / Под ред. Н.С. Егорова.— М.: Высш. шк., 1989. – 688 с.
9. Технология пищевых производств / Под ред. Л.П. Ковальской. – М.: Колос, 1997. – 752 с.
10. Тихомиров, В.Г. Технология пивоваренного и безалкогольного производства / В.Г. Тихомиров. – М.: Колос. 1998. – 448 с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение-----	3
Правила работы в микробиологической лаборатории-----	4
Микроскоп и техника микроскопирования микроорганизмов---	4
Лабораторное занятие №1. Микроскопирование микроорганизмов. Устройство и правила работы с микроскопом. Настройка света по Келеру. Приготовление прижизненных препаратов микроорганизмов-----	9
Лабораторное занятие №2. Приготовление препаратов фиксированных клеток. Окраска клеток по Граму-----	12
Лабораторное занятие №3. Морфология актиномицетов, грибов, дрожжей-----	17
Лабораторное занятие №4. Методы стерилизации. Лабораторная посуда, инструменты и их подготовка. Характеристика и приготовление питательных сред-----	24
Лабораторное занятие №5. Методы посева и культивирования микроорганизмов. Количественный учет микроорганизмов»-----	33
Лабораторное занятие №6. Микробиологическое исследование воды и воздуха-----	38
Лабораторное занятие №7. Изучение микрофлоры зерна, муки и комбикормов-----	45
Лабораторное занятие №8. Микрофлора хлебобулочных, макаронных, кондитерских изделий-----	48
Лабораторное занятие №9. Возбудители порчи пищевых продуктов-----	52
Лабораторное занятие №10. Микробиологическое исследование консервов-----	57
Лабораторная работа № 11. Микробиологический контроль производственной культуры дрожжей в пивоварении-----	64
Приложение -----	67
Литература -----	68

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Составители: Машанов А.И.
Матюшев В.В.
Скуратова Е.В.

Редактор Т.М. Мастрич

Санитарно-эпидемиологическое заключение № 24.49.04.953.П. 000381.09.03 от 25.09.2003 г.
Подписано в печать 22.10.2004. Формат 60x84/16. Бумага тип. № 1.
Офсетная печать. Объем п.л. Тираж 110 экз. Заказ №

Издательство Красноярского государственного аграрного университета
660017, Красноярск, ул. Ленина, 117