

Технологический институт – филиал ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Н.Х. КУРЬЯНОВА

**ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ
по дисциплине
«МИКРОБИОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ И ГИГИЕНА»**




Димитровград 2017

УДК 620.2


ББК 30.609

Составитель: Н.Х. Курьянова.

Н. Х. Курьянова. Лабораторный практикум. «Микробиология, санитария и гигиена», специальность 35.02.06 Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции / Технологический институт – филиал ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ – Димитровград, 2017. – 71 с.

Заседание методической комиссии инженерно-технологического факультета
Протокол № 1 от «31» августа 2017 года  А.В. Поросятников
(подпись)

Рецензент:

Губейдуллина З.М., к.б.н., доцент кафедры ««Экономики и естественнонаучных
дисциплин» 
(подпись)

© ФГОУ ВО Технологический институт – филиал Ульяновский ГАУ, 2017 г.

© Н.Х. Курьянова, 2017 г.

СОДЕРЖАНИЕ

Лабораторное занятие № 1	
Техника безопасности в бактериологической лаборатории. Устройство микроскопа. Особенности микроскопии в микробиологической практике (иммерсионная система). Формы микроорганизмов.	4
Лабораторное занятие № 2	
Методы работы с микроорганизмами	10
Лабораторное занятие №3	
Изучение морфологических признаков бактерий	21
Лабораторное занятие № 4	
Изучение морфологии плесневых грибов.	27
Лабораторное занятие № 5	
Организация и схема микробиологического контроля на предприятиях пищевой промышленности приготовление посуды, питательных сред для проведения микробиологического анализа	38
Лабораторное занятие № 6	
Изучение роста микроорганизмов и влияние на него рН и температуры культивирования	45
Лабораторное занятие № 7	
Санитарно-гигиенический контроль условий производства	50
Лабораторное занятие № 8	
Микробиологическое исследование мяса	58
Лабораторное занятие № 9	
Микробиологическое исследование сырого и пастеризованного молока	61
Библиографический список	70

Лабораторно-практическое занятие № 1

Техника безопасности в бактериологической лаборатории.

Устройство микроскопа. Особенности микроскопии в бактериологической практике (иммерсионная система).

Формы микроорганизмов.

Цель занятия. Усвоить правила работы в бактериологической лаборатории. Ознакомиться с техникой безопасности и личной профилактикой. Освоить работу с микроскопом и особенности иммерсионной системы. Изучить формы бактерий.

Материалы и оборудование. Микроскопы, окрашенные микроскопические препараты с различными формами микроорганизмов, иммерсионное масло, мультимедийная презентация.

Методические указания. После краткого объяснения преподавателя о порядке проведения работы в лаборатории, необходимости соблюдения техники безопасности, студенты знакомятся с устройством светового микроскопа, осваивают технику микроскопии готовых препаратов, изучают морфологию микроорганизмов на препаратах и зарисовывают их в тетради.

Бактериологическая лаборатория - это учреждение для проведения бактериологических исследований при экспертизе пищевых продуктов и кормов, санитарной оценки воды, воздуха и почвы.

Лабораторию размещают в отдельном здании, вдали от проезжих дорог. В ней предусматривают приемное отделение, бактериологический, вирусологический, биохимический, серологический и патологоанатомический отделы; выделяют специальные помещения для стерилизации посуды и питательных сред, для мытья посуды. Для выполнения работы в асептических условиях оборудуют специальные изолированные помещения - боксы. Лабораторных животных размещают в виварии. Кроме того, имеются комнаты для специалистов, обслуживающего персонала, кабинет заведующего, помещения для библиотеки, склада, весовой, раздевалки и др.

Учебная микробиологическая лаборатория предназначена для овладения студентами методами выделения и изучения различных микроорганизмов. В ней проводятся лабораторные занятия, предусмотренные программой, а также научно-исследовательская работа.

Правила работы в лаборатории

1. В помещение входить только в халате и белой шапочке (косынке).
2. В лабораторию нельзя вносить посторонние вещи, продукты.
3. В помещении лаборатории категорически запрещается есть.
4. Перед началом работы обязательно проверяют наличие и исправность приборов, посуды, горелок и др. О замеченных недостатках, неисправностях сообщают преподавателю или лаборанту.
5. Нельзя зажигать одну горелку от другой.

6. Не касаться металлическими и другими предметами проводов и контактных частей электросети. Не включать без ведома преподавателя или лаборанта любую электроаппаратуру.

7. Материал, используемый для учебных занятий, должен рассматриваться как особо опасный.

8. При распаковке материала, присланного для исследования, необходимо соблюдать осторожность - банки с материалом снаружи обтирают ватой, смоченной дезинфицирующим раствором и ставят только на подносы или кюветы.

9. При исследовании поступившего материала и работе с бактериологическими культурами придерживаются правил исключающих возможность инфицирования работника.

10. Вскрытие трупов лабораторных животных производят в специальной одежде, на соответствующем оборудованном столе с помощью необходимых инструментов, используя для этих целей кювету, залитую воском (или парафином). Инструменты после вскрытия помещают в стакан с дезинфицирующим раствором или обжигают на пламени горелки, на стол класть запрещается.

11. При работе с жидким инфицированным материалом используют резиновые баллоны, соединенные с пипеткой.

12. Жидкости, содержащие патогенных микробов, переливают над сосудом с дезинфицирующим раствором.

13. Если патологический материал попал случайно на стол, его немедленно удаляют тампоном, смоченным дезинфицирующим раствором. При попадании зараженного материала на кожу, конъюнктиву, слизистую ротовой полости принимают экстренные меры к обеззараживанию.

14. По окончании работы использованные культуры микроорганизмов, инструменты и поверхность стола обеззараживают. В конце занятия бактериальные культуры и другой материал студенты сдают преподавателю, а рабочее место приводят в порядок. Перед уходом из лаборатории необходимо, вымыть руки и обработать их спиртом.

Уборка лабораторного помещения

Помещение лаборатории ежедневно до работы убирают влажным способом. Пыль с поверхностей протирают увлажнённой тряпкой смоченной дезинфицирующим раствором. После окончания работы стены, покрытые метлахскими плитками или окрашенные масляной краской, моют горячей водой с мылом или стиральным порошком. Полы моют 3-5% раствором дезинфектанта. Потолки, карнизы, верхняя часть стен, окрашенные клеевой краской, не реже одного раза в неделю очищают от пыли пылесосом.

Подготовка бокса к работе

Ежедневно перед началом работы полы протирают дезинфицирующим веществом (2-5 % раствором хлорамина); воздух обеззараживают бактерицидными лампами, установленными на высоте 2-2,5 м от поверхности пола, из расчета одна лампа БУВ-30 (1,5-2,5 Вт) на 1м³ помещения. При указанных усло-

виях бокс облучают 2 ч. Перед началом работы лампы выключают. Для того чтобы предотвратить заражение бокса, образцы материалов, подлежащие исследованию, вносят в бокс после предварительного тщательного протирания их 3 % раствором формалина. Работа в боксе проводится в стерильных халатах, защитных масках и тапочках, специально предназначенных для бокса. Воздух в боксе следует регулярно, не менее 2 раз в неделю, проверять на бактериальную контаминацию. Чашки с мясопептонным агаром и средой Сабуро оставляют открытыми на 15 мин. Посев на мясопептонном агаре выдерживают в термостате 48 ч при 37° С, чашки со средой Сабуро - 96 ч при 22° С. Допустимым ростом считается 5 колоний на чашках. Количество колоний больше 5 при 15-минутной экспозиции является показателем высокой контаминации воздуха бокса. В этих случаях помещение бокса нуждается в дополнительной, более тщательной обработке. Не менее одного раза в неделю помещение бокса моют горячей водой с мылом, дезинфицирующими средствами и протирают досуха. По окончании работы берут пинцетом кусок ваты, смачивают его в 5 % растворе хлорамина или формалина и протирают им поверхность стола на рабочем месте.

Устройство биологического микроскопа

Микроскоп - сложный оптический прибор, используемый для изучения морфологии и тинкториальных свойств микроорганизмов. Принципиально все микроскопы устроены одинаково и состоят из механической части и оптической системы.

Механическую часть составляют:

- основание микроскопа,
- тубусодержатель,
- тубус,
- система винтов для передвижения,
- предметный столик,
- револьвер.

Оптическую часть (рис. 1) составляют:

- окуляр,
- объективы,
- осветительный аппарат.

Работа с иммерсионной системой

Объективы малого увеличения ($\times 3,5$, $\times 8$, $\times 9$) применяют главным образом для предварительного осмотра препарата.

Объективы среднего увеличения ($\times 20$, $\times 40$) применяют для изучения крупных клеток микроорганизмов (например грибов). Эти объективы называются сухими, поскольку при микроскопии между фронтальной линзой и препаратом находится воздух. При этом благодаря различию показателей преломле-

ния воздуха ($n=1$) и стекла ($n=1,52$) часть лучей, освещающих препарат, рассеивается и не попадает в объектив.

Объективы больших увеличений ($\times 85$, $\times 90$) носят название иммерсионных. При работе с ними необходима максимальная освещенность препарата; устранение рассеивания, неизбежного при работе с сухими объективами, в данном случае достигается путем использования иммерсионных жидкостей, у которых показатель преломления близок к показателю преломления стекла (рис.2).

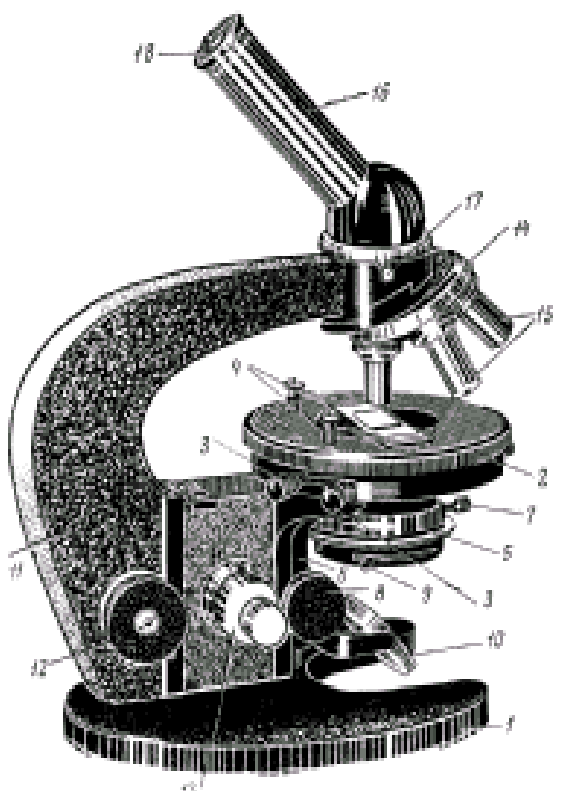


Рис.1. Устройство микроскопа МБР-1. 1-основание; 2-предметный столик; 3-винты для перемещения предметного столика; 4-клеммы; 5-конденсор; 6-кронштейн конденсора; 7-винт, укрепляющий конденсор; 8-рукоятка перемещения конденсора; 9-рукоятка ирисовой диафрагмы конденсора; 10-зеркало; 11-тубусодержатель; 12-рукоятка макрометрического винта; 13-рукоятка микрометрического винта; 14-револьвер; 15-объектив; 16-наклонный тубус; 17-винт для крепления тубуса; 18-окуляр.

Вначале под малым увеличением микроскопа наводят свет и определяют на препарате участок микроскопирования. Затем на выбранное место наносят каплю иммерсии и осторожно (под контролем глаз с боку) погружают в нее фронтальную линзу иммерсионного объектива ($\times 90$). Иммерсионные объективы имеют короткое фокусное расстояние (до 2,3 мм) поэтому наводить на рез-

кость следует путем поднимания объектива, а не опускания его, так как при небольшом рабочем расстоянии можно раздавить препарат и повредить фронтальную линзу. После грубой наводки, которую проводят с помощью макрометрического винта, руки переводят на микрометрический винт и осуществляют точную фокусировку. По окончании работы объектив поднимают, убирают препарат, а с фронтальной линзы кусочком фильтровальной бумаги убирают иммерсию.

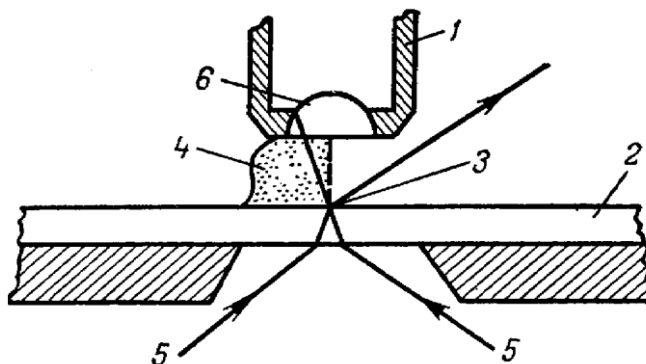


Рис. 2. Схема лучей в иммерсионной системе. 1 - объектив микроскопа; 2 - предметное стекло; 3 - объект исследования; 4 - иммерсионное масло; 5 - лучи света; 6 - фронтальная линза объектива.

Морфология бактерий

По форме бактерий подразделяют на три основные группы: шаровидные (кокки), цилиндрические (палочки) и извитые (рис. 3).

Для различных видов **кокков** характерно своеобразное расположение клеток, обусловленное способом деления.

Микрококки - беспорядочно расположенные кокки, в диаметре не превышают 0,5 мкм.

Диплококки - кокки, располагающиеся попарно, делятся в одной плоскости.

Стрептококки - деление их происходит в одной плоскости и образующиеся клетки не разъединяются, располагаясь цепочками, различной длины.

Тетракокки - сочетание шаровидных микробов по четыре, деление у которых происходит в двух взаимно перпендикулярных плоскостях.

Стафилококки - делятся в различных плоскостях без особой закономерности, образуя беспорядочное скопление клеток, иногда напоминающее грозди винограда.

Сарцины по форме напоминают пакеты или тюки. Образуются в результате деления в трёх взаимно перпендикулярных плоскостях.

Палочковидные микроорганизмы подразделяются на бактерии, бациллы и клостридии.

Бактерии - цилиндрической формы, не образуют спор.

Бациллы - спорообразующие палочки по типу дыхания аэробы, т.е. для своего развития нуждаются в свободном молекулярном кислороде воздуха.

Клостридии - спорообразующие палочки, по типу дыхания анаэробы (не использующие кислород воздуха), диаметр их споры превышает ширину микробной клетки.

Извитые бактерии разделяются на вибрионы, спириллы и спирохеты.

Вибрионы имеют форму запятой, летящей чайки, поворот вокруг оси не превышает четверти оборота.

Спириллы - характеризуются небольшим числом крупных завитков (не более пяти). Передвигаются с помощью жгутиков.

Спирохеты - имеют штопорообразную форму с большим количеством завитков. На конце тела пучком расположены жгутики.

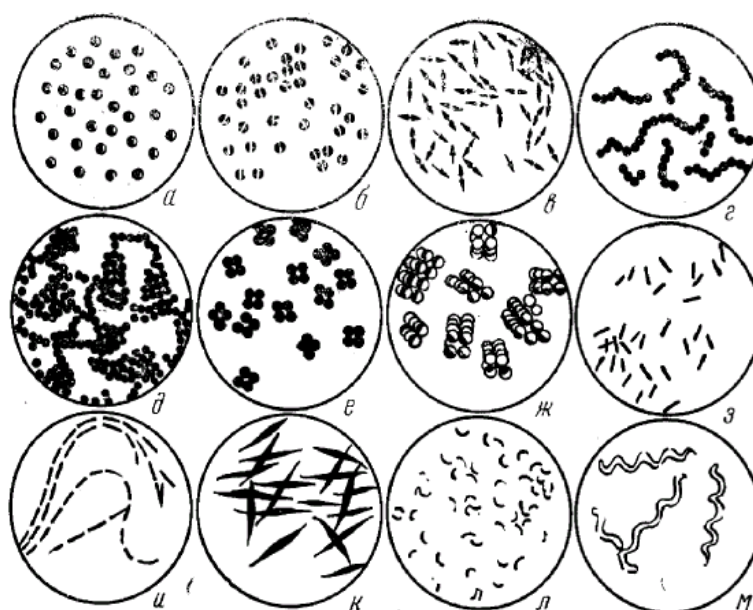


Рис. 3. Основные формы бактерий:

а – микрококки; *б, в* – диплококки; *г* – стрептококки;
д - стафилококки; *е* – тетракокки; *ж* – сарцины;
з, и, к - палочки; *л* – вибрионы; *м* – спириллы.

Задание для выполнения на занятии

1. Записать в тетради правила работы в лаборатории.
2. Законспектировать раздел «Устройство биологического микроскопа» и схематично зарисовать в рабочей тетради биологический микроскоп.
3. Законспектировать раздел «Работа с иммерсионной системой».
4. Зарисовать в рабочей тетради основные формы бактерий.
5. Зарисовать в рабочей тетради основные виды посуды для микробиологических исследований: чашки Петри, плоские бутылки-матрацы, пробирки и колбы с поплавками, колбы конические Эрленмейера, колбы кругло- и плоскодонные, пипетки Мора, пастеровские пипетки, пробирки биологические (без ранта).

Контрольные вопросы

1. Каковы правила работы в бактериологической лаборатории?
2. Опишите методику подготовки к работе микробиологического бокса.
3. Каково устройство светового микроскопа?
4. Опишите работу с иммерсионной системой.
5. Какова морфология бактерий?

Домашнее задание

1. Изучить назначение следующих аппаратов и приборов: термостата, автоклава, сушильного шкафа, центрифуги, лабораторного рН-метра.
2. Подробно изучить и записать в тетради назначение основных составляющих механической и оптической частей биологического микроскопа.
3. Изучить состав и назначение микробиологических питательных сред, порядок приготовления и стерилизации питательных сред. Составить конспект в рабочей тетради.

Лабораторно-практическое занятие № 2 Методы работы с микроорганизмами

Цель занятия. Овладеть методикой приготовления мазка-препарата для микроскопии из микробной взвеси. Ознакомиться с методами приготовления красящих растворов. Отработать методику простого и сложного методов окраски приготовленных препаратов.

Материалы и оборудование. Набор красок, спирт ректификат 96,6%, дистиллированная вода, фильтровальная бумага, предметные стекла, бактериологические петли, пинцеты, пробирки с микробными взвесями, микроскопы. Взвеси бактерий с вакцинным штаммом сибирской язвы, клостридиями, готовые препараты с капсулообразующими бактериями, подвижные бульонные культуры эшерихий 18 часового роста, предметные и покровные стекла, плакаты, 2% раствор сафранина, водный раствор малахитовой зелени, карболовый фуксин Циля.

Методические указания. После объяснений преподавателя студенты конспектируют материал занятия и осваивают нижеизложенные методики, выполняя задания в соответствии с разделом «Задание для выполнения на занятии».

Техника приготовления мазков

Исследуемый материал распределяют тонким слоем по поверхности предметного хорошо обезжиренного стекла.

Мазки готовят из культур микробов, патологического материала (мокрота, гной, моча, кровь и др.) и из органов трупов.

Приготовление препарата для микроскопии складывается из следующих этапов:

1. Приготовление мазка на обезжиренном предметном стекле.
2. Высушивание препарата.
3. Фиксация мазка.
4. Окраска мазка.

В правильно приготовленном препарате микробные клетки должны быть расположены в один слой.

Техника приготовления мазков определяется характером исследуемого материала.

Приготовление мазков из микробных культур с жидкой питательной среды и из жидкого патологического материала (моча и др.)

Маленькую каплю исследуемой жидкости наносят бактериальной петлей на предметное стекло и круговыми движениями петли распределяют равномерным слоем в виде кружка диаметром в копеечную монету.

Приготовление мазков из крови

На предметное стекло, ближе к одному из его концов, наносят каплю крови. Второе, шлифованное, стекло, которое должно быть уже предметного, ставят на первое под углом 45° , затем подводят к капле крови до соприкосновения с ней. После того как кровь растечется по шлифованному краю, стеклом делают скользящее движение справа налево, равномерно распределяя кровь тонким слоем по всей поверхности стекла. Толщина мазка зависит от величины угла между стеклами: чем острее угол, тем тоньше мазок. Правильно приготовленный мазок имеет светло-розовую окраску и одинаковую толщину на всем протяжении.

Приготовление толстой капли

На середину предметного стекла пастеровской пипеткой наносят каплю крови или прикладывают стекло непосредственно к капле крови, выступающей из пальца. Нанесенную на стекло кровь размазывают бактериальной петлей так, чтобы диаметр образующегося мазка соответствовал величине копеечной монеты. Стекло оставляют в горизонтальном положении до подсыхания крови. Кровь в “толстой капле” распределяется не равномерно, образуя неровный край.

Приготовление мазка из вязкого материала

Материал, нанесенный на предметное стекло ближе к узкому краю, накрывают другим предметным стеклом. Стекла слегка придавливают друг другу. После этого свободные концы стекол захватывают 1 и 2 пальцами обеих рук и разводят в противоположные стороны так, чтобы при движении оба стекла плотно прилегли друг к другу. Получаются мазки с равномерно распределённым материалом, занимающим большую часть.

Приготовление мазка из культур с плотных питательных сред

На середину чистого, хорошо обезжиренного стекла наносят каплю водопроводной воды, в нее вносят бактериальную петлю с небольшим количеством исследуемой микробной культуры так, чтобы капля жидкости стала слегка мут-

новатой. После этого излишек микробного материала на петле сжигают в пламени горелки и приступают к приготовлению мазка по описанному выше способу.

Приготовление мазков из органов и тканей

Поверхность органа с целью обеззараживания прижигают накаленными branшами пинцета, делают по этому месту надрез и из глубины остроконечными ножницами вырезают небольшой кусочек ткани, который помещают между двумя предметными стеклами. Далее поступают так же, как при приготовлении мазка из гноя и мокроты. Если ткань органа плотная, то из глубины разреза делают скальпелем соскоб. Полученный при соскабливании материал распределяют тонким слоем по поверхности стекла скальпелем или бактериальной петлей. Для изучения взаимного расположения элементов ткани и находящихся в ней микроорганизмов делают мазки-отпечатки. Для этого вырезанный из середины органа небольшой кусочек ткани захватывают пинцетом и прикладывают поверхностью среза к предметному стеклу несколько раз последовательно, получая, таким образом, ряд мазков-отпечатков.

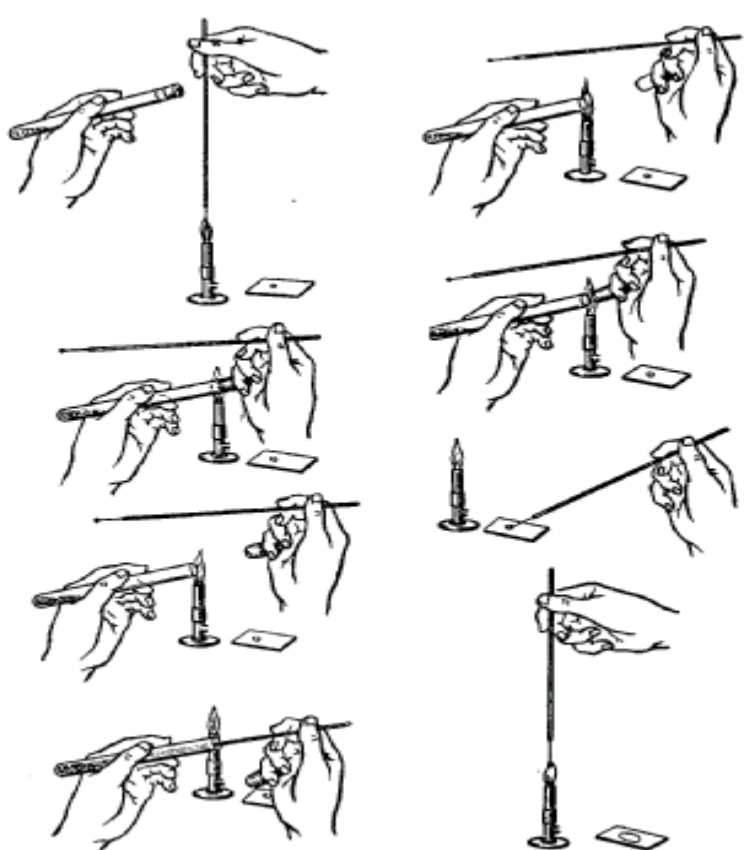


Рис. 4 Схема приготовления препарата-мазка
Высушивание и фиксирование мазков

Приготовленный на предметном стекле мазок высушивают и после высыхания фиксируют. При фиксировании мазок закрепляется на поверхности предметного стекла, и поэтому при последующей окраске препарата микробные клетки не смываются. Кроме того, убитые микробные клетки окрашиваются лучше, чем живые. Различают физический способ фиксации, в основу которого положено воздействие высокой температуры на микробную клетку, и химиче-

ские способы, предусматривающие применение средств, вызывающих коагуляцию белков

Физический способ фиксации. Предметное стекло с препаратом берут пинцетом или I и II пальцами правой руки за ребра мазком кверху и плавным движением проводят 2-3 раза над верхней частью пламени горелки. Весь процесс фиксации должен занимать не более 2 с. Надежность фиксации проверяют следующим простым приемом: свободную от мазка поверхность предметного стекла прикладывают к тыльной поверхности левой кисти. При правильном фиксировании мазка стекло должно быть горячим, но не вызывать ощущения ожога.

Химический способ фиксации. Для фиксации мазков применяют химические вещества такие как безводный метиловый спирт, этиловый (винный) спирт 96%, жидкость Никифорова (смесь спирта и наркозного эфира в соотношении 1:1), жидкость Карнуа (спирта 96% 60 мл, хлороформа 30 мл, уксусной кислоты ледяной 10 мл)

Предметное стекло с высушенным мазком погружают в склянку с фиксирующим веществом и затем высушивают на воздухе.

Краски, применяемые в микробиологической практике

Для окрашивания микробов используют анилиновые красители (основные, кислые и нейтральные). Микроорганизмы лучше окрашиваются основными красками. Для окраски препаратов готовят спиртовые, водно-спиртовые и водные растворы. В некоторых случаях добавляют в качестве протравы карболовую кислоту, щелочь и др. Наиболее часто употребляемыми красителями являются следующие:

синие - метиловый синий, водный синий, опаловый синий;

красные - фуксин основной, конго красный, сафранин, нейтральный красный, фуксин кислый;

фиолетовые - метиловый фиолетовый, кристаллический фиолетовый, генцианвиолет;

зеленые - малахитовый зеленый, бриллиантовый зеленый, светло-зеленый;

желто-коричневые - хризоилин, везувин.

Техника окраски простым методом

1. При простом методе окраски на фиксированный мазок наливают несколько капель какого-либо спиртоводного или водного раствора красок на 1—2 минуты; чаще всего для этой цели применяется фуксин 1: 10 или леффлеровская метиленовая синька.

2. Затем краску смывают дистиллированной водой и мазок обсушивают между двумя полосками фильтровальной бумаги. Обычно Фуксином 1: 10 красят 10—30 секунд, а метиленовой синькой – 2-10 мин. Фуксин окрашивает мазки более интенсивно. А при окраске метиленовой синькой получают нежные, более изящные препараты. Мазок после обсушивания фильтровальной бу-

магой должен быть совершенно сухим, в противном случае при соприкосновении оставшейся влаги с кедровым маслом образуется эмульсия и при микроскопии получится неясное изображение. Вообще же продолжительность окраски зависит от вида и качества красящего раствора, степени восприимчивости микроба к окраске и толщины мазка.

При простой окраске микробные тела воспринимают цвет применяемой краски так же интенсивно, как и ядра клеток; в то же время цитоплазма и весь фон мазка (если это не мазок из чистой культуры) окрашиваются в тот же цвет, но несколько бледнее. Фуксин и генцианвиолет относятся к более интенсивно окрашивающим краскам; метиленовая синька окрашивает значительно бледнее. Восприятие окраски зависит не только от свойств красок, но и от свойств подвергаемых окраске микробов. Большинство микробов легко и быстро окрашивается водными или спиртоводными растворами красок.

Для повышения красящей способности воздействуют на краску высокой температурой (нагреванием) до появления паров (вплоть до кипения). Варьируя степень нагревания, можно получать различные степени силы окраски. Удлинение срока воздействия красящего раствора на объект также может в известной мере усилить степень окраски.

Техника окраски сложным методом

Сложные методы окраски основаны на особенностях физико-химического строения микробной клетки. Сущность этих методов заключается в воздействии на мазок двух красящих веществ, из которых одно является основной, главной краской, а другое дополнительной - контраст. После воздействия первой краской мазок обесцвечивают и только после этого подвергают дополнительной окраске. В качестве обесцвечивающих веществ может быть применен целый ряд химических реагентов (кислоты, щелочи, спирт, ацетон и др.). Обмывание мазка простой водой также является в какой-то степени чисто механическим процессом обесцвечивания, но для этого необходимо продолжительное время; кроме того, обесцвечивание получается неполное. По отношению к обесцвечивающим веществам можно разбить микробов на группы легко и трудно обесцвечиваемых. Не все виды микробов одинаково относятся к обесцвечивающим реагентам; некоторые являются кислото- и спиртоустойчивыми, другие только кислотоустойчивы. Наконец, некоторые, как, например, споры, энергично противостоящие воздействию всех обесцвечивающих веществ, относятся к группе краскоустойчивых.

Сложные методы окраски имеют важное дифференциально-диагностическое значение для характеристики изучаемого микроба.

Окраска по Граму

1. На фиксированный мазок кладут кусочек фильтровальной бумаги пропитанной 1%-ым спиртовым раствором генцианвиолета. Наносят на бумажку 2-3 капли воды. Окрашивают 2-3 минуты.

2. Бумажку снимают и, не промывая препарата водой, наносят раствор Люголя на 2 минуты.

3. Сливают раствор Люголя и препарат обрабатывают 96%-ным этиловым спиртом в течение 20-30 секунд.

4. Тщательно промывают мазок водой.

5. Окрашивают мазок фуксином Пфейффера в течение 2-3 минут.

6. Препарат промывают водой.

7. Высушивают и микроскопируют.

Грамположительные микроорганизмы окрашиваются в фиолетовый цвет, а грамотрицательные - в розовый.

Этот метод позволяет все микроорганизмы дифференцировать на две группы: грамположительные (гр+) и грамотрицательные (гр-).

Сущность окраски по Граму состоит в том, что отношение к краскам зависит от химического состава клетки и структурных особенностей клеточной стенки (наличие муреина и частично липида). В составе клеточной стенки грамположительных микроорганизмов большое количество муреина, воздействие этиловым спиртом вызывает разбухание муреина, что приводит к уменьшению диаметра пор и снижению проницаемости клеточной стенки. Поэтому не происходит вымывания красителя и обесцвечивания микробной клетки. В клеточной стенке грамотрицательных микроорганизмов муреиновый слой меньших размеров, диаметр пор больше и спирт легко проходит через клеточную стенку, вымывая краситель. Микробная клетка принимает цвет дополнительного красителя (красный). Кроме того, в поверхностном слое грамположительных микроорганизмов находится магниевая соль рибонуклеиновой кислоты, которая в присутствии йода в кислой среде образует прочное соединение с основными красителями. Это так же препятствует обесцвечиванию их спиртом.

Пример: *Escherichia coli* (кишечная палочка) и *Salmonella cholerae suis* (возбудитель сальмонеллеза свиней) - грамотрицательные и окрашиваются в розово-красный цвет. *Listeria monocitogenes* (возбудитель листериоза), *Streptococcus equi* (возбудитель мыта) - грамположительные и окрашиваются генцианвиолетом в фиолетовый цвет.

Окраска кислотоустойчивых микроорганизмов

В природе существует группа микроорганизмов, устойчивых к действию кислот, щелочей и спиртов. Они относятся к роду *Mycobacterium* (возбудители туберкулеза, паратуберкулеза крупного рогатого скота, проказы человека). Химическая структура цитоплазмы и клеточной оболочки микроорганизмов данной группы отличается содержанием значительного количества жировосковых веществ, в частности стеариновых кислот (в том числе фтионовой кислоты до 40%), поэтому проникновение красителя в клетку затруднено. Для их окраски используют протравливание (нагревание мазка с красителем над пламенем). Окрасившись, они прочно удерживают краску и не обесцвечиваются кратковременным действием кислоты.

Окраска по Циль-Нильсену

1. Фиксированный на пламени мазок покрывают полоской фильтровальной бумаги, наливают на нее карболовый раствор фуксина и подогревают; при появлении паров прекращают нагревание и оставляют краску на препарате еще на несколько минут (2-3 минуты). Дав препарату остыть, удаляют пинцетом бумажку и обмывают мазок водой.

2. Обесцвечивают препарат 5-10 % водным раствором серной кислоты в течение 3-5 секунд (до желтоватого оттенка мазка). Вместо серной кислоты можно применить 5 % раствор азотной или 3 % раствор соляной кислоты.

3. Мазок тщательно промывают водой.

4. Споласкивают 96° спиртом.

5. Снова промывают водой.

6. Докрашивают в течение 3-5 минут леффлеровской метиленовой синькой или водным раствором 1: 1000 малахитовой зелени или метиловой зелени.

7. Краску смывают водой и препарат высушивают.

Микроскопическая картина: туберкулезные палочки - рубиново красные, остальные, за исключением возбудителя паратуберкулеза, кислото- и спиртоустойчивых сапрофитов, - синие.

Для обесцвечивания мазков при окраске по Циль-Нильсену вместо растворов кислот и спирта особо рекомендуется применение солянокислого алкоголя (соляной кислоты - 3 мл+96° спирта - 97 мл) до слабо заметного розоватого оттенка препарата. После этого мазок ополаскивают водой и докрашивают метиленовой синькой и т. д. по основной прописи. Указанным методом достигается одновременное испытание бацилл на кислото- и спиртоустойчивость. Среди видов кислотоустойчивых сапрофитов встречаются спиртоподатливые разновидности, палочки же туберкулеза и паратуберкулеза всегда кислото- и спиртоустойчивы.

Окраска спор

При неблагоприятных условиях для микробов (отсутствие питательной среды, высушивание, неблагоприятная температура и др.) в цитоплазме некоторых микроорганизмов образуются споры. Формируются они внутри вегетативной клетки, являясь эндоспорами. Палочковидные грамположительные микроорганизмы, образующие округлые споры, диаметр которых не превышает ширину микробной клетки, относятся к роду *Bacillus* и называются бациллами. Микроорганизмы рода *Clostridium* имеют споры диаметр которых превышает ширину микробной клетки и называются клостридиями. По форме они бывают овальные и круглые (рис. 5).

Споры устойчивы к воздействию высоких температур, химических веществ, к высушиванию, длительно сохраняются в почве, что объясняется их особым строением и химическим составом, в особенности ее оболочки. Поэтому споры стойки к действию красителей.

Все методы окраски спор основаны на обеспечении проникновения красителя через трудноокрашиваемую оболочку споры. Поэтому применяют про-

траву. После охлаждения оболочка вновь становится плотной и не пропускает дополнительный краситель.

Техника окраски спор методом Трухильо

1. На фиксированный мазок накладывают небольшой кусочек фильтровальной бумаги и на нее наносят водный раствор малахитовой зелени.
 2. Подогревают препарат на пламени горелки до появления паров и выдерживают в течение 3 минут
 3. Промывают дистиллированной водой.
 4. Докрашивают 0,25%-ным водным раствором основного фуксина 1 минуту.
 5. Промывают водой и высушивают.
- Микрокартина: споры зеленые, а вегетативные клетки красные.

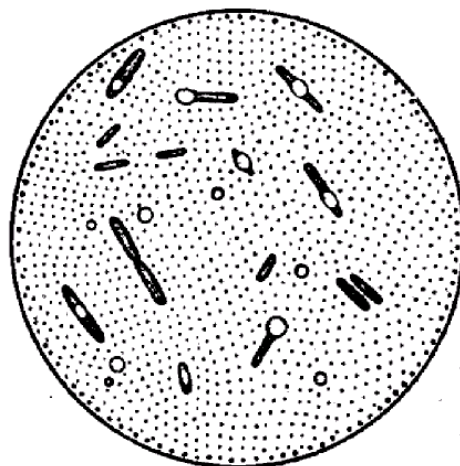


Рис. 4. Споры микроорганизмов различных типов

Окраска капсул

Тело микробной клетки покрыто рыхлым слизистым слоем. У некоторых видов микроорганизмов этот слой развивается очень сильно и тогда он называется капсулой. *Капсула - муциноподобное вещество, высокомолекулярный полисахарид, является производным наружного слоя оболочки.* Наличие капсулы является важным диагностическим признаком при идентификации и дифференциации возбудителей некоторых инфекций (сибирской язвы, пневмококковой пневмонии и др.) (рис. 5). Патогенные микроорганизмы образуют капсулу в инфицированном организме. Она является фактором вирулентности и защищает бактериальную клетку от фагоцитоза и бактерицидного действия сыворотки крови. Капсульное вещество плохо окрашивается. Поэтому при приготовлении препарата для обнаружения капсулы выполняют следующие правила:

- а) мазок готовят из свежего материала, так как капсула быстро лизируется;

б) фиксируют мазок химическим способом, для окраски применяют метохроматические краски, то есть при использовании которых цитоплазма окрашивается в один цвет, а капсула - в другой;

в) промывать мазок водой следует слабо и кратковременно.

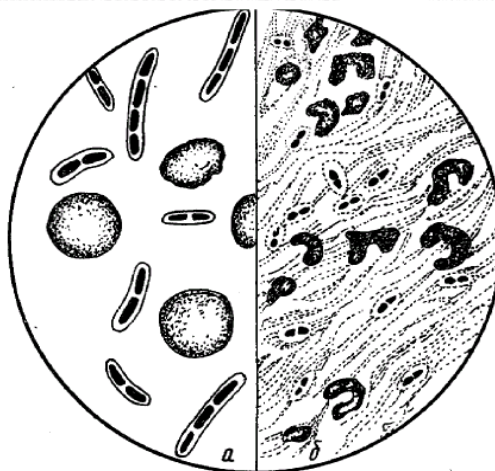


Рис.5. Капсула у бактерий: а - *бацилла сибирской язвы*; б – *диплококк*

Техника окраска капсул по методу Ольта

1. Свежий горячий 2%-ный раствор сафранина наносят на фиксированный мазок, окрашивают 5-7 минут.

2. Быстро промывают водой и высушивают.

Тело клетки окрашивается в красно-кирпичный цвет, капсула в - желто-оранжевый.

Определение подвижности бактерий

Подвижности бактерий важный видовой признак и производится при диагностических исследованиях: результат учитывают при идентификации микроорганизмов. У подвижных видов способность самостоятельного поступательного (и вращательного) движения обусловлена наличием *жгутиков* - *специальных тонких нитевидных образований*. Жгутики бывают различной длины. Их диаметр настолько мал, что они невидимы в световом микроскопе (менее 0,2 мкм). У разных групп бактерий количество и расположение жгутиков неодинаково. Жгутики плохо воспринимают красители. Методы сложной окраски искажают подлинный вид жгутиков, поэтому в лабораториях окраску жгутиков не осуществляют, а исследуют бактерии в живом состоянии.

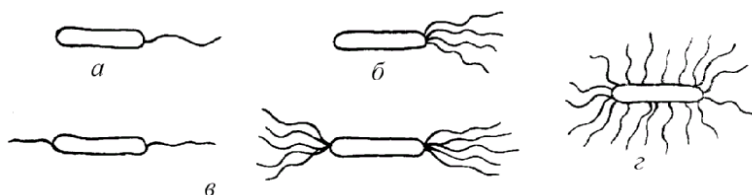


Рис. 6. Типы расположения жгутиков у бактерий

В зависимости от расположения и количества жгутиков микробы подразделяют(рис. 7):

а) *монотрихи* - микроорганизмы имеющие на одном из полюсов один жгутик, движения активные, поступательные (псевдомонас);

б) *лофотрихи* - микробы имеющие на одном из полюсов пучок жгутиков (листерии);

в) *амфитрихи* - микробы, имеющие жгутики на обоих полюсах микробной клетки;

г) *перитрихи* - микробы, у которых жгутики расположены по всей поверхности клетки(*E.coli*).

Есть виды микроорганизмов, обладающие подвижностью, но жгутиков не имеют (спирохеты, лептоспиры). Их движение обусловлено импульсивными сокращениями двигательного фибриллярного аппарата микробной клетки.

Для определения подвижности у бактерий необходимо использовать культуру не старше суточного возраста, так как старые культуры утрачивают способность передвигаться.

Определение подвижности микроорганизмов

Определение подвижности бактерий методом «висячая капля»

Каплю молодой (18-20 часовой) бульонной культуры бактерий бактериологической петлей наносят на покровное стекло. Специальным предметным стеклом с углублением (луночкой) накрывают каплю культуры так, чтобы покровное стекло с каплей находилось в центре луночки и прилипло к предметному стеклу (края луночки предварительно слегка смазывают вазелином). Препарат перевертывают стеклом вверх, и капля «повисает» над луночкой (рис. 8). Препарат микроскопируют при затемненном поле зрения, сначала при малом, затем при среднем или большом увеличении. На светлом фоне микробы темно-серые.

Определение подвижности бактерий методом Шукевича

Для этого каплю микробной взвеси наносят в конденсат скошенной плотной питательной среды в пробирке. Подвижные микроорганизмы, передвигаясь из конденсата, растут на поверхности среды; неподвижные виды размножаются только в конденсате среды («не заходя» на поверхность агара).

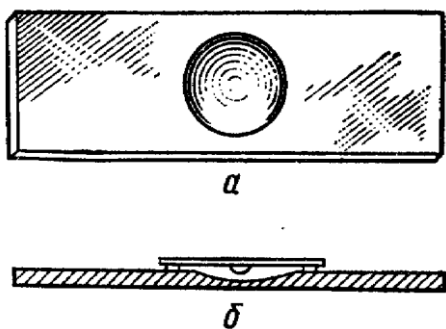


Рис. 7. Исследование микробов на подвижность *а* - стекло с луночкой; *б* - «висячая капля».

Определение подвижности бактерий

методом «раздавленная капля»

Каплю бактериальной взвеси наносят на обычное предметное стекло, осторожно накрывают покровным стеклом и слегка придавливают пальцем. Микроскопию проводят так же как и в методе «висячая капля».

Определение подвижности бактерий

методом посева уколом в полужидкий агар

Для этого бактериологической петлей производят посев исследуемой культуры уколом до дна пробирки с полужидкой питательной средой. Подвижная культура растет по всей питательной среде, образуя равномерное помутнение, а неподвижная - только по уколу в виде стержня, сохраняя прозрачность незасеянного участка среды.

Задание для выполнения на занятии

1. Законспектировать раздел «Техника приготовления мазков» в рабочей тетради.
2. Законспектировать раздел «Высушивание и фиксирование мазков» в рабочей тетради.
3. Законспектировать раздел «Техника окраски простым методом» в рабочей тетради. Приготовить из предложенных культур микроорганизмов мазок и окрасить простым методом окраски микроорганизмов Увиденную в поле микроскопа картину зарисовать в рабочей тетради, используя цветные карандаши.
4. Законспектировать раздел «Техника окраски сложными методами» в рабочей тетради. Приготовить мазки из предложенных культур и окрасить и окрасить их по Граму, по Цилю-Нильсену, по Трухильо и по Ольту. Увиденную в поле микроскопа картину зарисовать в рабочей тетради, используя цветные карандаши.
5. Законспектировать раздел «Определение подвижности бактерий» в рабочей тетради. Зарисовать в рабочей тетради типы расположения жгутиков у бактерий. Освоить методики определения подвижности микроорганизмов.

Контрольные вопросы

1. Какова техника приготовления мазков из различного исследуемого материала?
2. Опишите методику «Техника окраски простым методом».
3. Каковы методики окраски микроорганизмов сложными методами окраски?
4. В чем сущность окраски по Граму?
5. Как определяют подвижность микроорганизмов?

Домашнее задание

1. Изучить порядок проведения посева и пересева микроорганизмов. Сделать конспект в рабочей тетради.
2. Подробно изучить и записать в тетради методы получения накопительных культур. Зарисовать в тетради рис.9.
3. Внимательно изучить и записать в тетради методы выделения чистых культур культур.

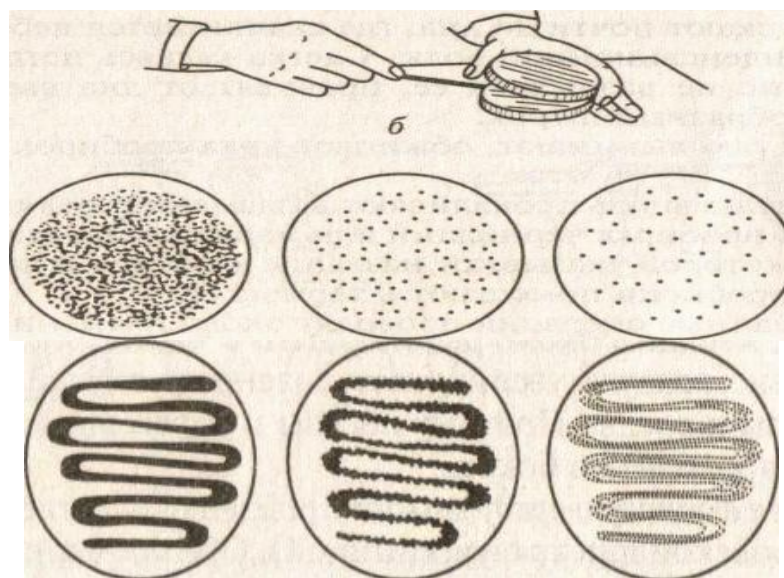


Рис. 9- Посев микроорганизмов на поверхность плотной среды в чашках Петри: *а* - шпатель Дригальского; *б* - положение чашки и рук при посеве шпателем; *в* - рост микроорганизмов после рассева шпателем; *г* - рост микроорганизмов после рассева петлей

Лабораторно-практическое занятие №3 Изучение морфологических признаков бактерий

Цель занятия. Изучить и описать колонии бактерий, выросших на агаризованной среде, величину, край профиль колоний; приготовить препараты бактерий, определить форму клеток, подвижность, наличие спор; пересеять изучаемые культуры на скошенный агар в пробирку.

Материалы и оборудование. Микроскопы биологические, спиртовки, предметные стекла, бактериальные петли, фуксин Циля, капельница с водой. Чашки Петри с колониями бактерий, пробирки с МПА по 10 мл (скошенный агар).

Методические указания. После объяснений преподавателя студенты конспектируют материал занятия и осваивают нижеизложенные методики, выполняя задания в соответствии с разделом «Задание для выполнения на занятии».

Термин «бактерии» происходит от лат. *bacterion* — палка, палочка. Бактерии относятся к прокариотным организмам. Это одноклеточные организмы. Размножение клеток осуществляется путем их роста и деления (обычно пополам, иногда на неравные части).

Клетки после деления могут оставаться соединенными, в результате чего возникают характерные группировки. Многие виды обладают жгутиками бактериального типа и в жидкой среде способны активно плавать; другим свойственно скользящее, сократительное, «щелкающее» или кувыркающееся движение на поверхности твердых сред. У одних видов образуются эндоспоры.

Клетки находятся внутри жесткой или полужесткой клеточной стенки, обеспечивающей постоянство формы.

Генофор бактерий состоит из нуклеоплазмы, которая не отделена от цитоплазмы ядерной мембраной.

В настоящее время принята классификация бактерий, утвержденная юридической комиссией Международного союза микробиологических обществ, представленная в Кратком определителе бактерий Берги. Царство *Procaryotae*, к которому относятся бактерии, состоит из двух отделов: первый — фототрофные прокариоты («фотобактерии»), которые здесь не рассматриваются, и второй — прокариоты, индифферентные к свету («скотобактерии»).

Методика выполнения лабораторной работы

1. Изучить и описать колонии бактерий, выращенных на плотной питательной среде в чашках Петри; результаты представить в табл. 1

- размер (диаметр) измеряют линейкой в миллиметрах: мельчайшие, точечные, крупноточечные - менее 1 мм;

- цвет колоний и субстрата под колониями (от белого до черного);

- форма - бывает круглая, овальная и т.д.

- край - при необходимости устанавливают с помощью лупы (рис. 10);

- поверхность - бывает гладкая, зернистая, морщинистая, концентрически или радиально исчерченная, бугристая, мучнистая, матовая, блестящая, влажная, сухая и др.;

- прозрачность - бывает прозрачная, полупрозрачная, непрозрачная;

- структура колонии - бывает однородная, мелкозернистая, волокнистая и др.;

- профиль - бывает изогнутый, каплевидный, плоский, выпуклый, вогнутый;

- консистенция (определяют при касании поверхности колонии бактериальной петлей) - бывает плотная, мягкая, тягучая, тестообразная и др.

На рис. 11 представлены фотографии различных бактериальных колоний

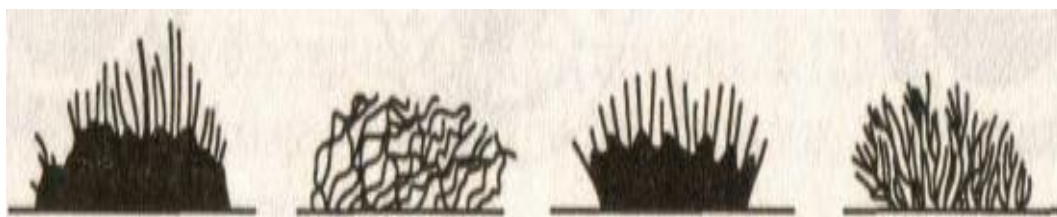


Рис 10. Края колоний

Колонии, различающиеся хотя бы одним из внешних признаков, следует рассматривать как разные типы. Каждый вид бактерий имеет вполне определенный тип колонии, поэтому по числу типов колоний в чашках Петри можно ориентировочно судить о разнообразии видового состава бактериальной флоры исследуемого пищевого продукта.

2. Определить форму бактерий пяти колоний и спорообразование клеток. Приготовить препараты бактерий, провести простую окраску и их микроскопическое исследование. Результаты записать в табл. 2 и схематично зарисовать.

На рис. 12 представлены фотографии цикла развития бактерий от споры до споры.

3. Определить подвижность бактерий. Приготовить препарат «висячая капля».

Движение бактериальных клеток лучше наблюдать в препарате «висячая капля», используя молодые бульонные или агаровые культуры в возрасте 6-12 ч, но не старше суточных. При наблюдении под микроскопом в поле зрения хорошо видно активное перемещение клеток в разных направлениях с разной скоростью. В отличие от самостоятельного движения клеток броуновское движение взвешенных частиц и неподвижных клеток характеризуется беспорядочными колебаниями на одном месте. Результаты записать в табл. 2.

4. Посеять культуры бактерий на скошенный агар. Сделать пересев культур бактерий со среды на чашках Петри в пробирки со скошенным агаром. Посевы поставить в термостат при температуре 30 °С на 24 ч.

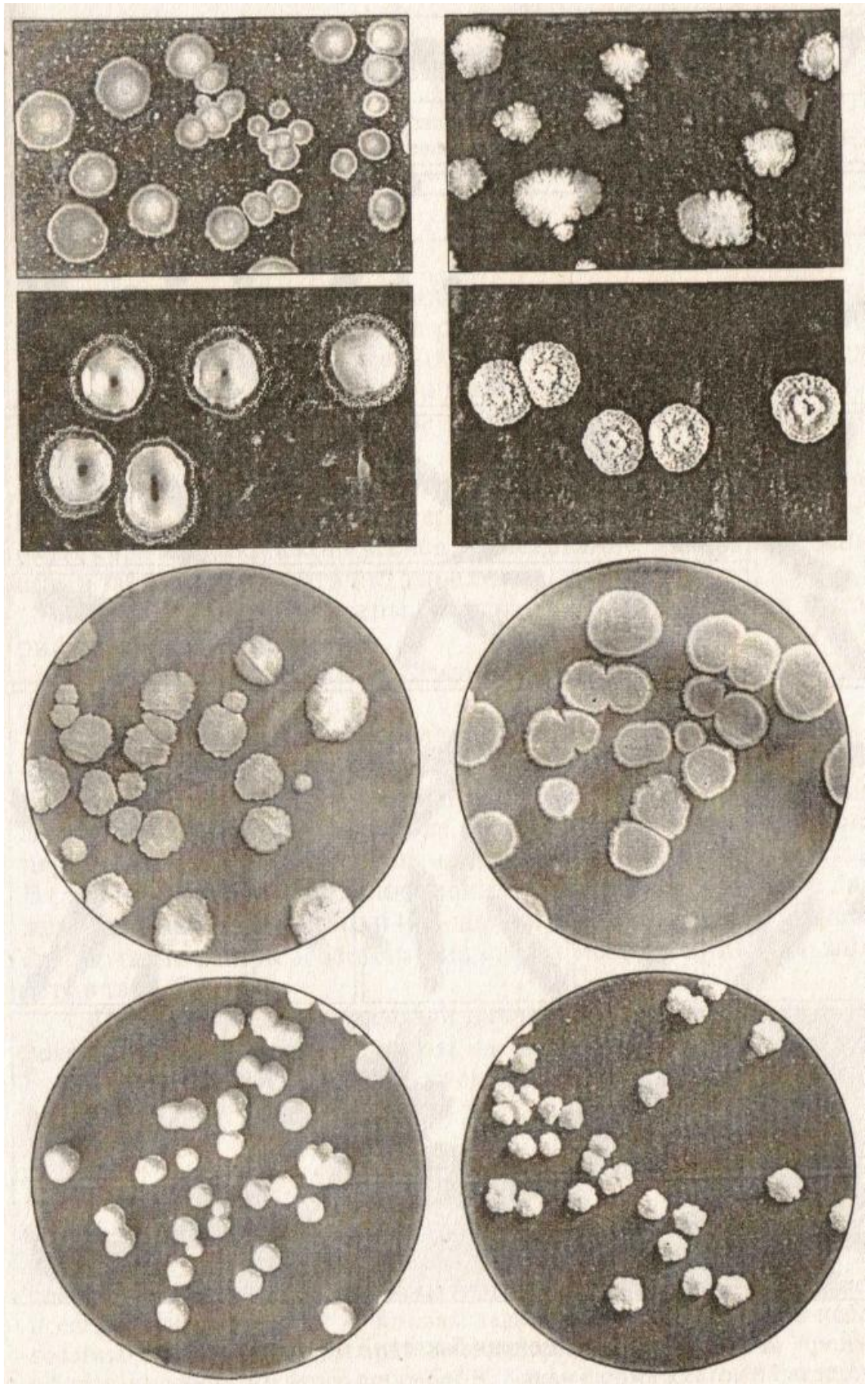


Рис 11. Колонии бактерий (фотографии).

Таблица 1

Культуральные признаки колоний бактерий

Описываемые признаки колоний	Номер колонии				
	1	2	3	4	5
Цвет					
Форма					
Край					
Поверхность					
Прозрачность					
Структура					
Профиль					
Консистенция					
Размер					

Таблица 2

Форма клеток, образование спор и подвижность

Номер колонии	Форма клеток	Взаимное расположение клеток	Спорообразование	Подвижность

Задание для выполнения на занятии

1. Законспектировать материал занятия.
2. Выполнить лабораторную работу в соответствии с методикой, зарисовывая рисунки и заполняя таблицы.

Контрольные вопросы

1. Какие существуют методы исследования морфологии бактерий?
2. Какие существуют способы фиксации бактериальных препаратов?
3. Каковы преимущества и недостатки прижизненного микроскопического исследования микробов?
4. Каковы задачи микроскопического исследования окрашенных препаратов микроорганизмов? Каковы преимущества и недостатки этого способа?
5. Какая форма клеток у бактерий?
6. Какие группировки клеток бывают у шаровидных бактерий и как они называются?
7. Какие бактерии образуют споры?
8. Каково значение спор у бактерий?
9. Какими свойствами обладают споры?
10. За счет чего бактерии активно двигаются?
11. Как называются бактерии с разным числом жгутиков?

Домашнее задание

1. Самостоятельно изучить культуральные и морфологические признаки дрожжей. Законспектировать материал в рабочей тетради и сделать рисунок «Морфология дрожжей».

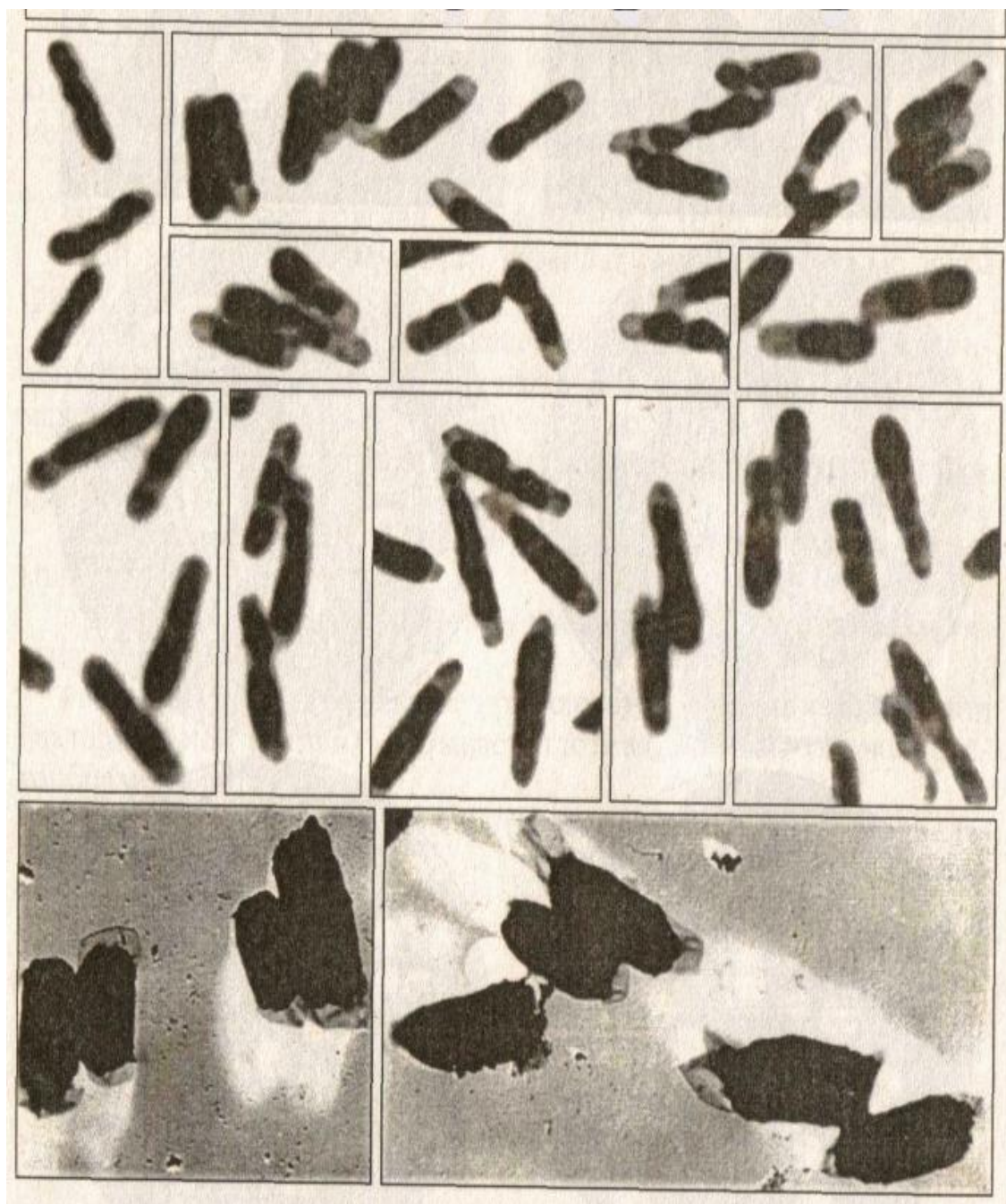


Рис 12. Цикл развития бактерий от споры до споры

Лабораторно-практическое занятие № 4 **Изучение морфологии плесневых грибов.**

Цель работы: изучить и описать культуральные признаки плесневых грибов, изучить морфологические признаки плесневых грибов, определить род плесневых грибов, используя ключ Никитинского-Алеева.

Оборудование инструменты: чашки Петри с колониями плесневых грибов, предметные и покровные стекла, препаровальные иглы, спирт с глицерином (1:1), красители, лупы, биологический микроскоп.

Методические указания. После объяснений преподавателя студенты конспектируют материал занятия и осваивают нижеизложенные методики, выполняя задания в соответствии с разделом «Задание для выполнения на занятии».

Грибы - обширная группа эукариотных организмов, включает в себя около 100 тыс. видов, разделенных на шесть классов: хитридиомицеты, оомицеты, зигомицеты, аскомицеты, базидиомицеты, дейтеромицеты.

Грибы - это самостоятельное царство эукариотных организмов, характеризующееся следующими признаками: образование хорошо выраженной клеточной стенки, абсорбтивное питание, размножение спорами, неподвижность в вегетативном состоянии и неограниченный рост, первично гетеротрофный способ питания, накопление в качестве запасного продукта гликогена.

Вегетативное тело грибов представляет собой мицелий, состоящий из ветвящихся гиф с верхушечным ростом и боковым ветвлением. Мицелий пронизывает субстрат и всей поверхностью поглощает из него питательные вещества - субстратный мицелий. Мицелий также располагается на поверхности субстрата и образует поверхностный и воздушный мицелий.

На воздушном мицелии обычно образуются органы размножения. Мицелий грибов бывает одноклеточный (не септированный) и многоклеточный (септированный).

Одноклеточный, или не септированный, лишенный поперечных перегородок мицелий, представляет собой одну гигантскую клетку с большим числом ядер (рис. 13, а).

Многоклеточный, или септированный мицелий, разделенный перегородками - септами на отдельные клетки, содержащие от одного до нескольких ядер (рис. 13, б).

Представители грибов классов хитридиомицетов, оомицетов, зигомицетов имеют неклеточный мицелий.

Представители грибов классов аскомицетов, базидиомицетов и дейтеромицетов состоят из клеточного мицелия с настоящими септами.

Грибы прекрасно развиваются на пищевых продуктах, промышленных материалах и изделиях, бумаге, произведениях искусства в музеях, вызывая их порчу и разрушение. Многие грибы образуют микотоксины и вызывают пищевые отравления.

Грибы поражают культурные растения, нанося большой вред сельскому хозяйству. Есть патогенные грибы.

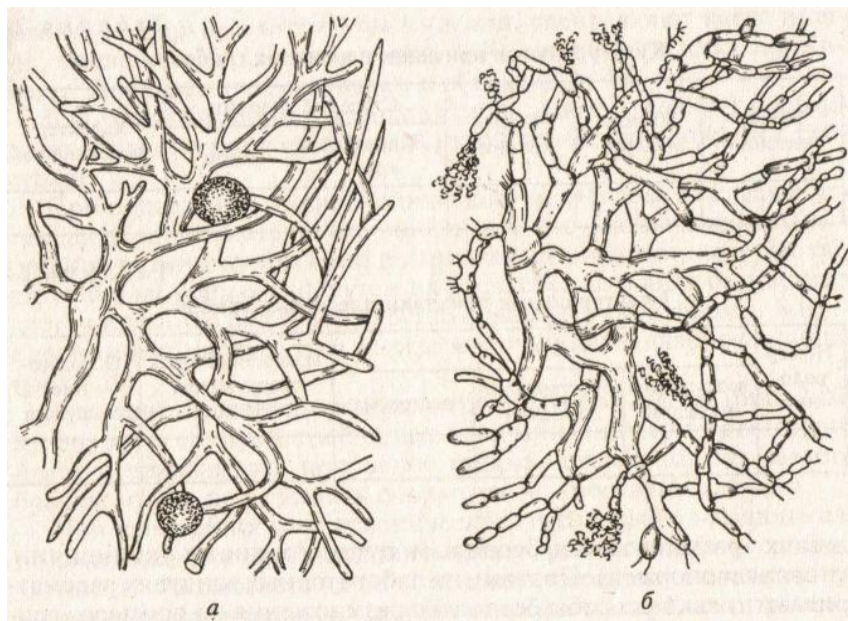


Рис. 13. Гифы грибов: а- не септированный, б - септированный

Методика выполнения лабораторной работы

1. Изучить культуральные признаки плесневых грибов. Большинство плесневых грибов, развиваясь на предметах окружающей среды пищевых продуктах, размножаются бесполом путем (оидиями, конидиями, спорангиоспорами). Поэтому на лабораторных занятиях рассматривают только способы бесполого размножения на примерах грибов - возбудителей порчи пищевых продуктов. Культуры этих грибов выращивают в чашках Петри на плотной питательной среде. Культуры в чашках не следует без надобности держать открытыми, так как споры грибов легко осыпаются и рассеиваются, что может привести к нежелательному заражению плесневыми грибами лаборатории, изучаемых культур и людей.

При изучении отмечают: размер колоний, их форму, плотность, строение наружного края и центра, характер поверхности, цвет колоний, окраску субстрата и обратной стороны колоний, выделение капель жидкости (экссудата). На плотных средах мицелиальные грибы образуют округлые или широко распространенные по поверхности, не врастающие в субстрат, пушистые, нитевидные, паутинообразные, ватоподобные или мучнистоподобные колонии. Вегетативный мицелий большинства видов не окрашен. Пигментирован только плодоносящий мицелий. Поэтому молодые колонии имеют белый или сероватый цвет. По мере развития органов плодоношения колонии приобретают желтый, розовый, бежевый, красный, зеленый, черный или другой цвет.

Результаты записывают в табл. 3 и 4.

Таблица 3 - Культуральные признаки плесневых грибов

Номер	Размер	Форма	Строение колонии		Характер поверхности
			Наружный край	Центр	

Таблица 4 - Культуральные признаки плесневых грибов

Номер колонии	Цвет			Изменение цвета среды вокруг колонии	Образование экссудата
	воздушного мицелия	субстратного мицелия	реверзума		

2. Изучение морфологических признаков плесневых грибов. Приготовление препаратов грибов для микроскопирования производят двумя обожженными и затем охлажденными препаровальными иглами. Отбирают небольшой кусочек мицелия вместе с плодоносящими гифами. Переносят его на хорошо обезжиренное предметное стекло в каплю смеси глицерина и этанола (1:1). Осторожно, не нарушая структуры мицелия, расправляют гифы иглами, после чего накрывают покровным стеклом и слегка прижимают. Препарат просматривают с объективом 40.

Для приготовления препарата гриба оидиум (*Oidium*) необходимо снять (слегка соскабливая) иглой его белый мицелий с субстрата.

При проведении микроскопического исследования следует установить многоклеточность мицелия и отсутствие специальных органов размножения. Гриб размножается оидиями, которые образуются на концах гиф путем их расчленения в виде бесцветных клеток прямоугольной или округло-прямоугольной формы. В препарате могут наблюдаться иногда цепочки нераспавшихся оидий (рис. 14).

Для приготовления препарата гриба мукор (*Mucor*) (рис. 15) нужно взять его пушистый воздушный мицелий черновато-серого цвета и накладывать покровное стекло осторожно, без резкого броска, чтобы не раздавить спорангии - вместилища спор.

При проведении микроскопического исследования выявить одноклеточное строение мицелия и органы размножения — спорангиеносцы. Рассмотреть их по всей длине, передвигая соответствующим образом препарат. Спорангиеносцы мукора, как правило, простые, неветвящиеся, отрастают от грибницы одиночно. Спорангии, сидящие на их верхушках (колонках), крупные, шарообразные, с массой спор, которые видны через тонкую прозрачную оболочку спорангия. Спорангиоспоры - одноклеточные, округлые или эллипсоидальные, гладкие, бесцветные или сероватого цвета. В препарате всегда есть много свободно лежащих спор, выпавших из некоторых лопнувших спорангиев

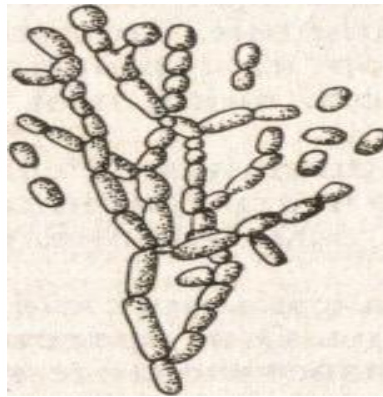


Рис. 14. *Oidium* с оидиоспорами

К мукооровым грибам относятся ризопус (*Rhizopus*) (рис. 16), который отличается от мукора образованием так называемых ризоидов и столонов, которые служат для захвата новой площади.

Для приготовления препарата гриба аспергиллус (*Aspergillus*) необходимо взять воздушный окрашенный мицелий с края колонии.

При микроскопическом исследовании найти многоклеточные гифы и органы размножения - конидиеносцы. Конидиеносец по внешнему виду простой, одноклеточный, неветвящийся. На его конце имеется булавовидное вздутие, на котором расположены в один ярус бутылочковидные клетки стеригмы, а на них одноклеточные споры в виде цепочек - конидии. Верхушка конидиеносца с массой неосыпавшихся спор кажется плотной, плохо просвечивается, ее можно рассмотреть лишь при осыпании спор (рис. 17).

Для приготовления препарата гриба пенициллиум (*Penicillium*) рекомендуется брать более молодую, зеленую часть грибницы, расположенную на границе с белым ее краем, заметно внедряясь в нее препаровальными иглами.

При микроскопическом исследовании найти многоклеточные гифы и органы размножения - конидиеносцы. Они представляют собой многоклеточные гифы, кистевидно разветвленные на концах. На концах ветвей расположены стеригмы (по 2 - 4), а на стеригмах - цепочки одноклеточных конидий, имеющих голубовато-зеленую окраску с различными оттенками (рис. 18) Для приготовления препарата гриба ботритис (*Botritis*) следует взять небольшой кусочек воздушной пушистой грибницы. На кладывать покровное стекло надо очень осторожно, чтобы не разрушить конидиеносцы, с которых легко осыпаются конидии. При микроскопическом исследовании выявить древовидно разветвленный конидиеносец, на концах ветвей которого кучками располагаются конидии - одноклеточные, сероватого цвета, овальной формы (рис. 19).

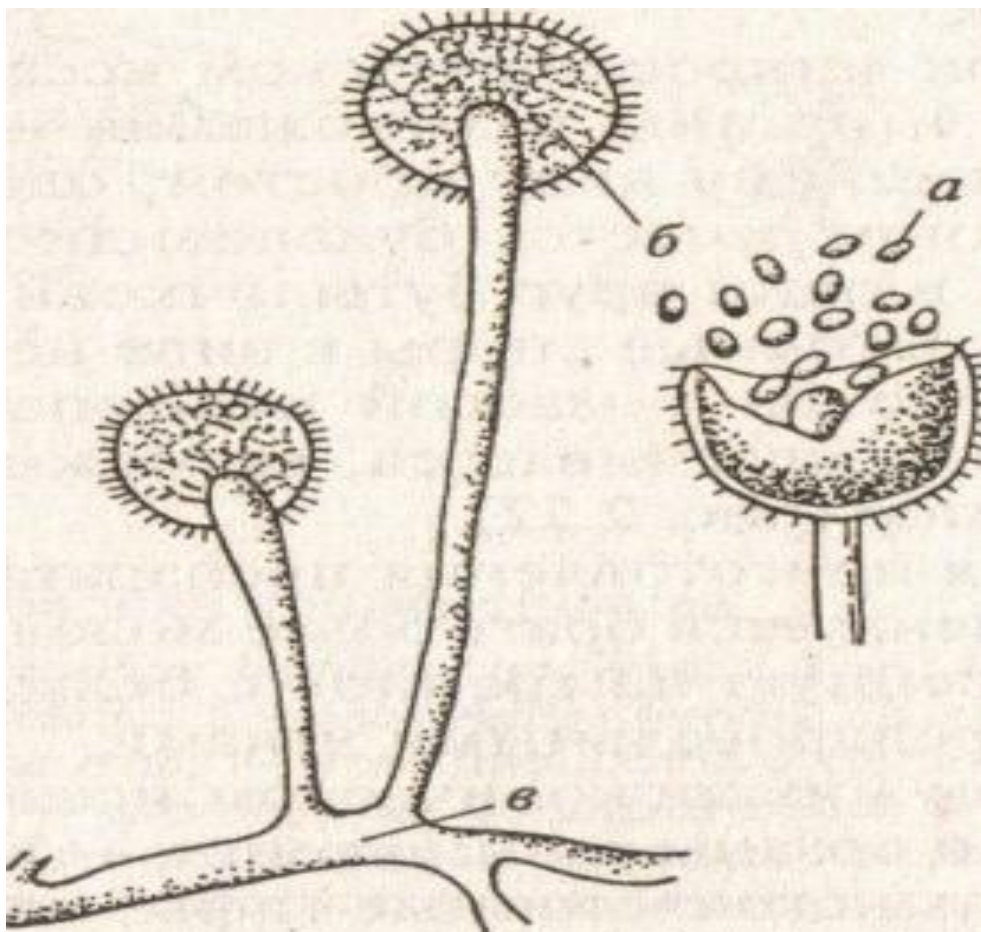


Рис. 15. *Mucor*:

а - спорангиоспоры; б – спорангий; в - гифа

Для приготовления препарата гриба альтернария (*Alternaria*) необходимо взять грибницу в ее черных участках, заметно внедряясь иглами в глубину грибницы.

При микроскопическом исследовании найти многоклеточный мицелий и крупные многоклеточные темноокрашенные конидии округло-грушевидной или заостренно-вытянутой формы. Обратите внимание на то, что конидиеносцы-гифы, на которых находятся конидии, слабо развиты и мало отличаются от других вегетативных гиф (чаще они слегка пигментированы - серого или бурого цвета). Конидии образуются на таких конидиеносцах поодиночке или короткими цепочками. Конидии альтернарии часто септированные.

При изучении отдельных возбудителей плесневения пищевых продуктов и промышленных товаров необходимо уметь распознавать их, т. е. установить название, принадлежность к тому или иному классу, семейству, роду, виду.

Товароведы пищевых продуктов и непродовольственных товаров чаще всего оперируют названием рода гриба.

Род гриба определяется по ключу Никитинского-Алеева.

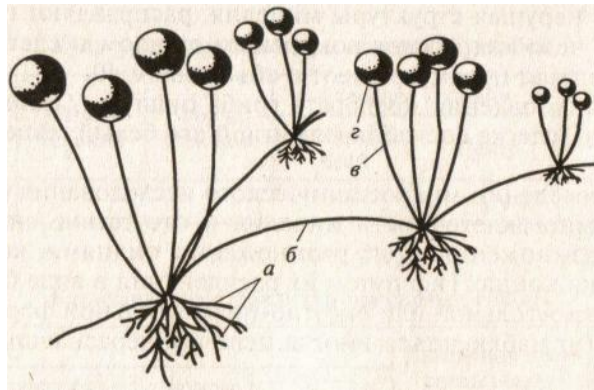


Рис. 16. *Rhizopus*:
 а – ризоиды; б – стolon; в – спорангиеносец; г – спорангий

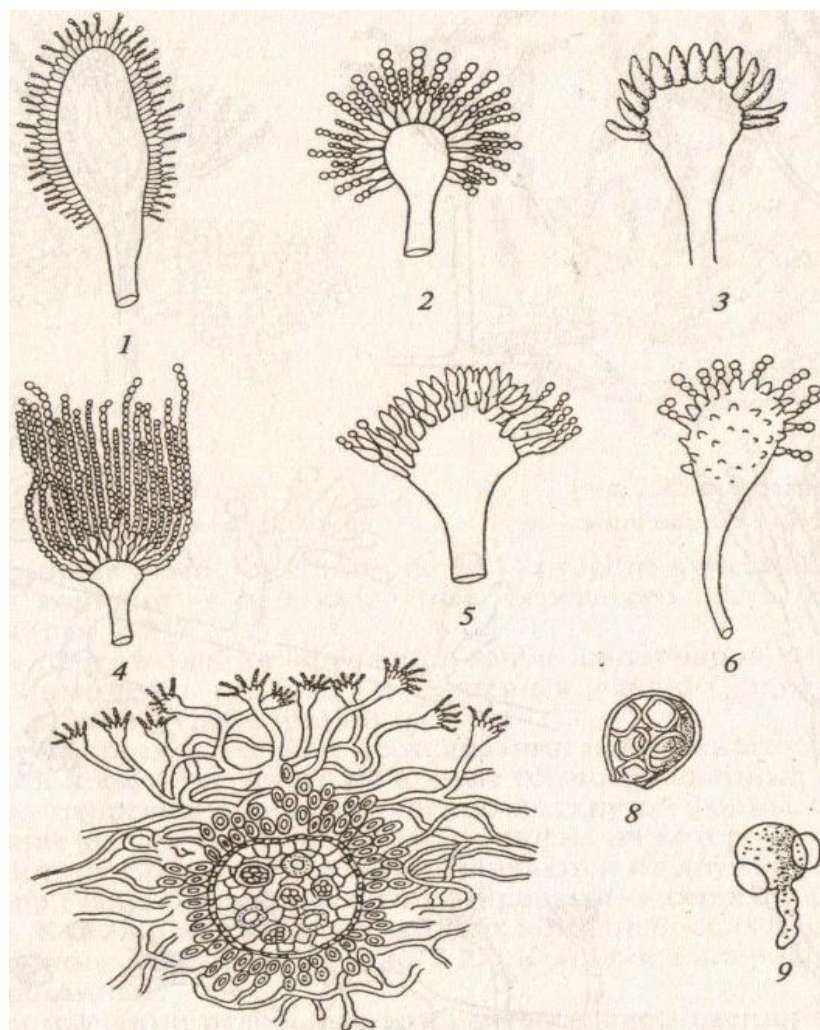


Рис. 17. *Aspergillus*. Головки конидиеносцев: 1-6; 7 – дерновинка конидиеносцев и под ней клектокарпий, окруженный оберткой из толстостенных клеток; 8 – сумка со спорами; 9 – прорастание аскоспоры

Ключ для определения рода плесневого гриба

1. Грибы размножаются спорангиоспорами, находящимися внутри спорангиев.

2. Грибы размножаются конидиями, образующимися снаружи на особых конидиеносцах, реже - прямо на мицелии. Спорангиеносцы, несущие спорангии, обычно простые, реже просто ветвящиеся. Спорангии все одинаковые.

Спорангиеносцы ветвящиеся. Спорангии двух видов: крупные на главной оси и мелкие (спорангиоли) на боковых ветвях.

3. Спорангиеносцы одиночные, простые, иногда ветвящиеся. Спорангии мелкие или крупные, всегда однородные, бесцветные или окрашенные. Споры круглые или эллипсоидальные, гладкие, бесцветные или серого цвета (мукор (*Mucor*)) (см. рис. 15).

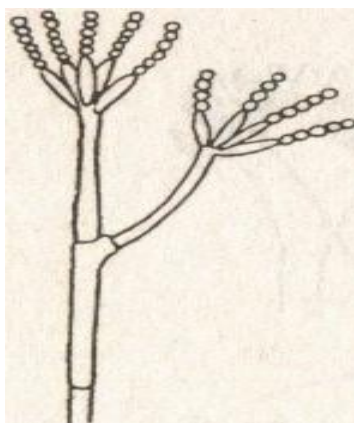


Рис. 18. *Penicillium*. Одномутовчатое строение конидиеносцев

Спорангиеносцы расположены кустиками, вырастающими на столонах из одного центра, с большими черными головками. Споры серого цвета, округло-яйцевидные, морщинистые. Ризопус (*Rhizopus*) (см. рис. 16).

4. Кустовидные ветви расположены мутовчато на главной оси спорангиеносца в один или несколько ярусов. Места ответвления не раздуты. Споры цилиндрические и эллипсоидальные, бесцветные (тамнидиум (*Thamnidium*)) (рис. 20).

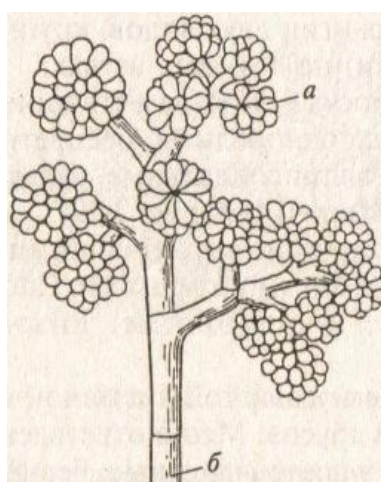


Рис. 19. *Botritis*: а – конидии; б - конидиеносцев

5. Конидии образуются на особых конидиеносцах, отличных от обыкновенных вегетативных гиф.

Конидиеносцы или мало отличаются от обыкновенных гиф, или их нет вовсе, и конидии образуются прямо на мицелии.

6. Конидиеносцы обильно ветвятся различным образом. Конидиеносцы не ветвятся или иногда ветвятся, но слабо. Ветвление простое, вильчатое или кустообразное.

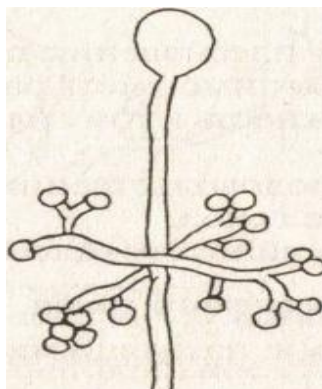


Рис. 20. *Thamnidium*

7. Ветвление древовидное. Ветвление кистевидное или многократно вильчатое, конидии располагаются цепочками, гладкие, бесцветные или окрашенные, округлые (пенициллиум (*Penicillium*)) (см. рис. 18).

8. Конидиеносцы древовидно разветвленные, большие. Ветви располагаются беспорядочно, конидии на концах ветвей развиваются кустиками, бесцветные, яйцевидные, гладкие (ботритис (*Botritis*)) (см. рис.19).

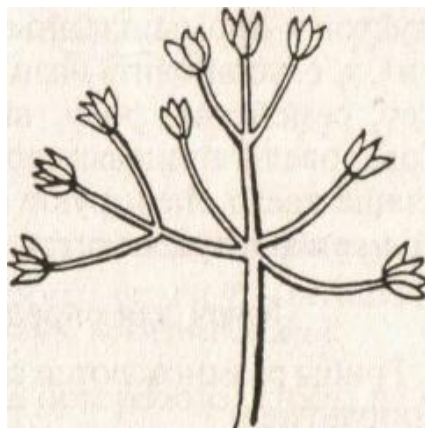


Рис. 21. *Verticillium*

Конидиеносцы древовидно разветвленные. Ветви располагаются мутовчато. Конидии образуются пучками или поодиночке, эллипсоидальные или вытянуто-яйцевидные, бесцветные или слабоокрашенные (вертициллиум (*Verticillium*)) (рис. 21).

9. Конидиеносцы неветвящиеся, длинные, с кустиками больших грушевидных конидий на конце. Конидии двухклеточные, бесцветные или розового цвета. Колонии гриба желто-розового цвета (трихотециум (*Trichotecium*)) (рис. 22).

Конидиеносцы и конидии иной формы.

10. Конидиеносцы ветвятся. Ветвление простое, реже вильчатое. Простые (как исключение просто ветвящиеся) конидиеносцы имеют на конце булавовидное или пузыревидное вздутие, иногда такое вздутие отсутствует.

11. Конидии крупные, неправильной формы, усеяны бородавочками, расположены цепочками, окрашены в коричневый цвет. Колонии сначала пушистые, потом слизистые, с сильным неприятным запахом (акаулиум (*Acaulium*)).

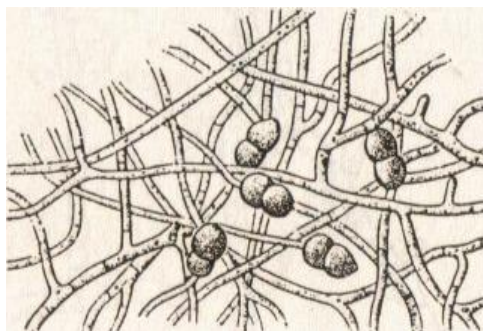


Рис. 22. *Trichotecium*

Конидии бесцветные, длинные, серпообразные, многоклеточные (с поперечными перегородками), иногда расположены цепочкой одна за другой или появляются прямо на мицелии. Колонии гриба часто окрашены в розовый цвет (особенно нижняя сторона) (фузариум (*Fusarium*)) (рис. 23).

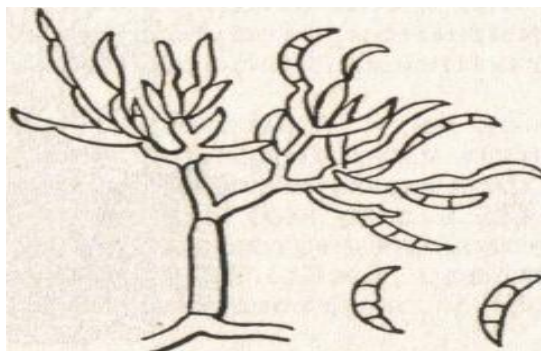


Рис. 23. *Fusarium*

12. Концы конидиеносцев булавовидно или пузыревидно раздуты и кругом покрыты стеригмами, несущими цепочки конидий.

Расширение на конце часто отсутствует, стеригмы располагаются только на вершине конидиеносцев, но не растут по сторонам. Конидии мелкие, округлые, гладкие, бесцветные, на стеригмах располагаются цепочками (цитромицес (*Cytromyces*)).

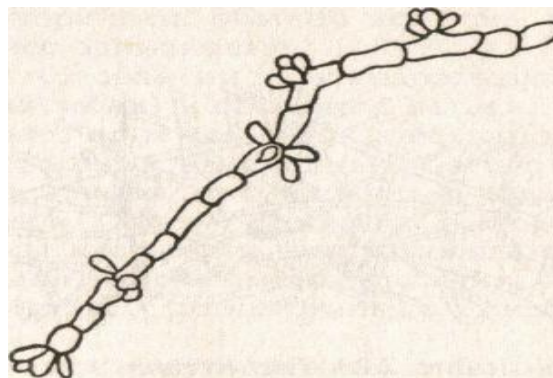
13. Стеригмы, покрывающие булавовидные вздутия, простые, неветвящиеся, несут цепочки конидий. Конидии округлые, гладкие или шиповатые, окрашенные или бесцветные (аспергиллус (*Aspergillus*)) (см. рис. 17).

14. Конидии образуются прямо на мицелии. Конидии образуются на конидиеносцах, мало отличающихся от обыкновенных гиф.

15. Конидиеносцы видны лишь при культуре в «висячей капле». Конидии легко рассыпаются. Места образования конидий видны в обычном микроскопическом препарате.

16. Одноклеточные конидии, бесцветные, веретеновидные или округло-удлиненные. Колонии слизистые, черные (дематийум (*Dematium*)) (рис. 2.4).

Конидии одноклеточные, яйцевидные, дрожжеобразные. Молодые колонии похожи на дрожжевидные, потом становятся лохматыми (монилия (*Monilia*)) (рис.



25).

Рис. 24. *Dematium*

17. Конидии получают простым делением мицелия и легко отпадают, бесцветные, прямоугольные, иногда соединены в короткие цепочки (оидиум (*Oidium*)) (см. рис. 14).

Конидиеносцы длинные, многоклеточные. Конидии неправильной формы (длинные, округлые или лимонообразные), окрашены в светлый оливково-зеленый цвет (кладоспориум (*Cladosporium*)) (рис. 26).

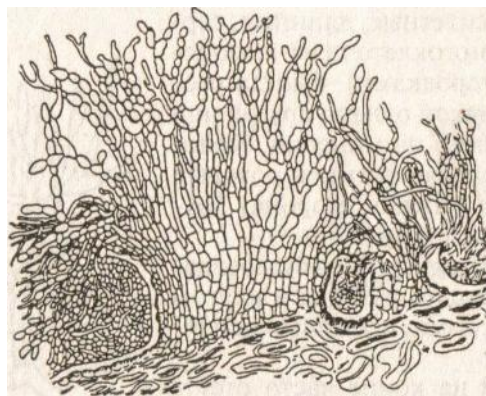


Рис. 25. *Monilia*

18. На медленно растущих колониях нет настоящих конидиеносцев. Мелкие, блестящие, желто-коричневого цвета конидии образуются очень длинными цепочками на концах обыкновенных гиф (катенулария (*Catenularia*)).

Крупные, многоклеточные, округло-грушевидной или заостренно-вытянутой формы конидии образуются в одиночку или короткими цепочками на ко-

ротких боковых ветвях вегетативных гиф, играющих роль конидиеносцев (альтернария (*Alternaria*)).

Есть и другие грибы, не вошедшие в определитель, но встречающиеся на пищевых продуктах, среди них есть грибы, патогенные для человека, вызывающий аспергиллез легких.

Студент должен идентифицировать грибы до рода, заполнить табл. 5 и схематично зарисовать органы спороношения.

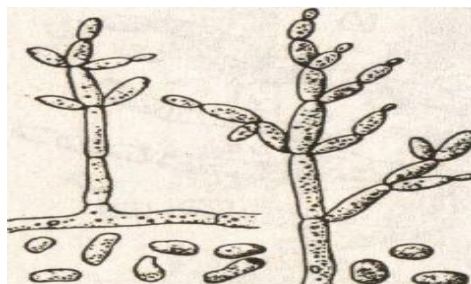


Рис. 26. *Cladosporium*

Таблица 5

Род плесневого гриба

Номер	Органы спороношения (рисунок)	Род гриба

Задание для выполнения на занятии

1. Законспектировать материал занятия.
2. Выполнить лабораторную работу в соответствии с методикой, зарисовывая рисунки и заполняя таблицы.

Контрольные вопросы

1. Каково строение тела гриба?
2. Какие признаки грибов называются культуральными?
3. Как приготовить препарат плесневых грибов?
4. Как размножаются грибы?
5. Какие типы спор бывают у грибов?
6. Чем различается строение конидиеносцев у разных плесневых грибов?

Домашнее задание

1. Зарисовать грибы, не вошедшие в определитель, но встречающиеся на пищевых продуктах.

Лабораторно-практическое занятие № 5
ОРГАНИЗАЦИЯ И СХЕМА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ НА ПРЕДПРИЯТИЯХ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ ПРИ ГОТОВЛЕНИИ ПОСУДЫ, ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Цель занятия: Ознакомление с задачами и целями осуществления микробиологического контроля, микробиологическими критериями безопасности молочных продуктов, схемой микробиологического контроля на предприятиях молочной промышленности. Приобретение навыков приготовления питательных сред, посуды для проведения микробиологического анализа.

Приборы и реактивы: Автоклав, электрические плитки, питательные среды: МПА, среда Сабуро, среда Кесслера, молоко, панкреатин, CaCO_3 , NaCl , яичный желток.

Посуда: Чашки Петри, колбы на 500 см^3 , пробирки, пипетки на 1 см^3 , ватно-марлевые пробки, вата, пергаментная бумага.

1.1 КРАТКИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Задачей микробиологического контроля на предприятиях молочной промышленности является определение различных микробиологических показателей.

1.1.1 Группы микробиологических критериев безопасности пищевых продуктов

1. Группа показателей санитарного состояния

Непосредственное выявление патогенных микроорганизмов (возбудителей пищевых инфекций) в пищевых продуктах невозможно из-за низкого их содержания в продукте по сравнению с содержанием сапрофитной микрофлоры. Поэтому при санитарной оценке пищевых продуктов используют косвенные методы, позволяющие определить уровень загрязнения человека выделениями человека. Чем выше этот уровень, тем вероятнее попадание в объект патогенных микроорганизмов – возбудителей кишечных инфекций.

Санитарная оценка пищевых продуктов проводится по двум микробиологическим показателям: общей бактериальной обсемененности (КМАФАнМ) и наличию бактерий группы кишечной палочки (БГКП).

Общая бактериальная обсемененность (КМАФАнМ) - количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в 1 г или 1 см^3 продукта.

Высокая бактериальная обсемененность пищевых продуктов свидетельствует о недостаточной термической обработке сырья, недостаточно тщательной мойке и дезинфекции оборудования, неудовлетворительных условиях хранения и транспортировки продукции.

Общую бактериальную обсемененность определяют в молочных продуктах, в которых отсутствует технически полезная микрофлора (микрофлора заквасок). Для определения этого показателя используют универсальные пита-

тельные среды: мясопептонный агар (МПА) или среду для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

Наличие бактерий группы кишечной палочки (БГКП) наблюдается во всех молочных продуктах (за исключением стерилизованных). БГКП объединяют представителей нормальной микрофлоры кишечника человека и относятся к семейству Enterobacteriaceae родов Escherichia, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Serratia. БГКП выполняют функцию индикатора фекального загрязнения и относятся к санитарно-показательным микроорганизмам.

Выбор БГКП в качестве санитарно-показательных микроорганизмов для оценки санитарного состояния пищевых продуктов не случаен. Санитарно-показательные микроорганизмы должны отвечать следующим требованиям:

- Эти микроорганизмы должны являться представителями нормальной микрофлоры организма, в нем развиваться и размножаться;
- Они должны в больших количествах выделяться из организма;
- В окружающей среде они должны длительное время сохранять свою жизнеспособность, но не размножаться;
- Определение этих микроорганизмов должно осуществляться простыми методами.

В нормативных документах (государственных, отраслевых стандартах (ГОСТ, ОСТ), технических условиях, требованиях СанПиНа) обычно указывается количество продукта, в котором БГКП не допускаются. При высоком уровне загрязнения продукта БГКП возрастает вероятность нахождения в нем патогенных микроорганизмов – возбудителей кишечных инфекций (дизентерии, брюшного тифа, холеры и др.). Для определения БГКП применяют накопительную среду Кесслера, а идентификацию этих бактерий проводят с использованием дифференциально-диагностической среды Эндо.

2. Группа условно-показательных микроорганизмов. К этой группе относятся микроорганизмы – возбудители пищевых отравлений, таких как Proteus vulgaris, Clostridium perfringens, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Clostridium botulinum.

В молочных продуктах, богатых белком (например, твороге, сыре) нормируется содержание коагулазоположительного золотистого стафилококка (Staphylococcus aureus) – возбудителя пищевой интоксикации. При определении золотистого стафилококка используют элективные питательные среды: молочно-солевой (МСА) или желточно-солевой (ЖСА) агар.

3. Группа патогенных микроорганизмов

Из патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах определяют сальмонеллы. Проводят исследования на наличие сальмонелл органы Санэпиднадзора. Обычно, сальмонеллы не допускаются в 25 г (см³) продукта.

Для определения сальмонелл используют накопительные питательные среды (селенитовую, Кауфмана, Мюллера) и дифференциально-диагностические среды (Плоскирева, Левина).

4.Группа показателей микробиологической стабильности продукта. К

этой группе относятся микроскопические грибы и дрожжи, которые, как известно, являются возбудителями порчи продукта. Этот показатель нормируется в молочных продуктах с растительными добавками. Динамику роста грибов и дрожжей определяют при установлении сроков годности и режимов хранения новых видов продуктов.

Кроме вышеперечисленных микробиологических показателей для прогнозирования качества выпускаемой молочной продукции целесообразно определять отдельные группы микроорганизмов, которые относятся к представителям технически вредной микрофлоры (липолитические, протеолитические бактерии) и полезной микрофлоры (молочнокислые и др. бактерии)

1.1.2 Организация микробиологического контроля

Микробиологический контроль осуществляется в лаборатории предприятия. При отсутствии микробиологической лаборатории на предприятии указанный контроль может осуществляться по договору с органами госсанэпиднадзора или лабораториями, аккредитованными для проведения микробиологических исследований.

Для проведения микробиологических исследований в лаборатории должен быть оборудован бокс, состоящий из двух помещений – собственно бокса и предбоксника. В боксе должны быть установлены бактерицидные лампы, количество которых определяют из расчета 2,5 Вт/м². Кроме того в лаборатории должно иметься следующее оборудование: термостаты (для культивирования микроорганизмов при определенной температуре), автоклав (для стерилизации питательных сред, посуды, инструментов), сушильный шкаф или печь Пастера (для стерилизации посуды), микроскопы (для определения качественного состава микрофлоры). Лаборатории молочных заводов должны быть аккредитованы государственной санитарно-эпидемиологической службой на право проведения исследований, характеризующих гигиенические показатели безопасности выпускаемой продукции.

При организации микробиологического контроля руководствуются «Инструкцией по микробиологическому контролю производства на предприятиях молочной промышленности, утвержденной 28.12.87 Госагропромом СССР, а также санитарными правилами и нормами СанПиН 2.3.4. 551-96, государственными, отраслевыми стандартами и техническими условиями на различные группы молочных продуктов.

Микробиологическому контролю подлежат:

- *Сырье* (например, сырое молоко), *полуфабрикаты* (например, закваски), *готовая продукция*. Такой контроль еще называют контролем технологического процесса. Он позволяет установить эффективность процесса пастеризации молока, выявить места инфицирования на различных этапах технологического процесса производства молочных продуктов.

- *Оборудование, трубопроводы, вспомогательные материалы, вода, воздух производственных помещений, тара, упаковочные материалы и др.* Микробиологический контроль этих объектов позволяет судить о санитарно-

гигиеническом состоянии производства и соблюдении санитарных норм и правил личной гигиены работников производства.

Так, готовая продукция (молоко, сливки, кисломолочные напитки) должны контролироваться микробиологической лабораторией предприятия не реже 1 раза в 5 дней, сметана и творог – не реже 1 раза в 3 дня, качество санитарной обработки оборудования должно оцениваться по каждой единице оборудования не реже 1 раза в 10 дней. Чистоту рук работников следует контролировать не реже 3 раз в месяц.

В приложении 1 приведена схема организации микробиологического контроля на примере производства кисломолочных напитков.

1.1.3 Характеристика питательных сред, используемых для микробиологического исследования молочных продуктов

Для микробиологического исследования молочных продуктов и проведения санитарно-бактериологического контроля условий производства используют *натуральные* (приготовленные из продуктов животного и растительного происхождения) *плотные и жидкие питательные среды*.

Плотные питательные среды готовятся из жидких путем внесения гелеобразующих веществ (агар-агара или желатина).

Агар-агар – полисахарид, не используемый микроорганизмами для питания. Получают его из морских водорослей. Плавится агар при температуре около 100⁰С и затвердевает при температуре около 40⁰С. Плотные питательные среды используют для количественного учета микроорганизмов (каждая клетка вырастает на плотной среде в виде изолированной колонии). Путем посева молочных продуктов и их разведений на плотные питательные среды определяют КМАФАнМ, содержание золотистого стафилококка, микроскопических грибов и дрожжей, количество молочнокислых, гнилостных бактерий, спор бактерий рода *Bacillus* и др. Содержание агар-агара в плотных питательных средах составляет около 2%.

Желатин – белок, который выделяют из костей и хрящей животных при их вываривании. Многие микроорганизмы, обладающие протеолитической активностью, могут гидролизовать желатин, а продукты гидролиза использовать в качестве источника питания. Способность разжижать среды с желатином является диагностическим признаком при идентификации микроорганизмов.

Питательные среды бывают *универсальные* (для культивирования микроорганизмов различных групп), *накопительные, элективные* (для накопления и выявления микроорганизмов определенных групп) и *дифференциально-диагностические* (для определения видовой принадлежности микроорганизмов).

В качестве универсальных питательных сред используют жидкие (например, мясопептонный бульон - МПБ) и плотные (например, мясопептонный агар (МПА) и среда Сабур).

Накопительные среды имеют жидкую консистенцию и используются для выявления микроорганизмов, содержание которых в продукте незначительное. Накопительные питательные среды используются для выявления наличия бак-

терий группы кишечной палочки -БГКП (среда Кесслера) и сальмонелл (среда Кауфмана, селенитовая среда). При наличии роста бактерий на накопительных питательных средах в дальнейшем, как правило, делается пересев на плотные дифференциально-диагностические питательные среды, которые используются для идентификации выросших на накопительных средах бактерий. Так, в качестве дифференциально-диагностической среды для идентификации БГКП используется среда Эндо.

Элективные (избирательные) питательные среды имеют плотную консистенцию. Примером элективной питательной среды может являться молочно-солевой агар, который используется для выявления в молочных продуктах золотистого стафилококка.

В заводских лабораториях для приготовления питательных сред обычно используют промышленно изготавливаемые сухие среды, которые представляют собой гигроскопические порошки, легко растворяющиеся в воде. Некоторые питательные среды готовят по прописям из отдельных компонентов (молока, пептона, дрожжевого экстракта, питательных солей и т.д.).

После приготовления питательных сред их разливают в пробирки или колбы, закрывают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют в автоклаве. Наиболее часто автоклавирование ведется при избыточном давлении 0,1 Мпа и, следовательно, температуре 121⁰С в течение 15-30 мин. Некоторые питательные среды стерилизуют при более низком избыточном давлении или текущим паром (не создавая избыточного давления).

2. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

Студенты знакомятся со схемой микробиологического контроля на предприятиях молочной промышленности. Готовят посуду, питательные среды для проведения микробиологического анализа.

2.1 Приготовление посуды для микробиологического анализа

Для проведения микробиологического анализа используют чашки Петри, которые герметично упаковываются в пергаментную бумагу и стерилизуются. Пипетки на 1 см³ закрывают ватными тампонами и также заворачивают в бумагу.

Стерилизация посуды осуществляется в автоклаве при избыточном давлении 0,1 Мпа в течение 30-40 минут или сухим жаром в сушильном шкафу или печи Пастера при 165-170⁰С в течение 1-1,5 часа.

Стерильную посуду следует хранить в плотно закрывающихся шкафах или ящиках с крышками в течение не более 30 суток.

2.2 Приготовление питательных сред из промышленно выпускаемых сухих сред

Заключается в растворении определенного количества порошка в воде, доведении полученной смеси до кипения и кипячении в течение 5 минут. Далее (при необходимости) среда фильтруется через ватно-марлевый фильтр и разливается в пробирки или колбы, которые закрываются ватно-марлевыми пробка-

ми. Далее среды стерилизуют в автоклаве. С использованием сухих сред готовят мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), среду Сабуро, среду Кесслера, среду для определения мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

2.3 Приготовление питательных сред из отдельных компонентов

2.3.1 Среда для культивирования молочнокислых бактерий

Обезжиренное молоко. Молоко отделяют от сливок, разливают в пробирки или колбы, закрывают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют в автоклаве при избыточном давлении 0,05 Мпа. Среду используют для изучения физиологических свойств и для группового количественного учета молочнокислых бактерий.

Эту среду используют также для получения лабораторной закваски из сухих и жидких заквасок и бактериальных концентратов.

Агар с гидролизированным молоком. Вначале готовят гидролизованное молоко путем гидролиза стерильного обезжиренного молока с помощью фермента панкреатина при 45⁰С в течение 3-х суток в присутствии хлороформа. Полученный гидролизат разводят водопроводной водой (в соотношении 1:2). Затем вносят 1,5-2% агара и 2-3% мела в виде тонкого порошка. Среду стерилизуют. Агар с гидролизированным молоком используют для количественного учета молочнокислых бактерий в молочных продуктах.

2.3.2 Среда для количественного учета гнилостных бактерий

Молочный агар готовят путем внесения 20% горячего стерильного обезжиренного молока в стерильный расплавленный 2% водный раствор агара-агара. Используется эта среда для количественного учета протеолитических и пептонизирующих бактерий (микрострептококков, маммококков).

2.3.3 Среда для выявления коагулазоположительных стафилококков

Основа – солевой агар: к мясопептонному бульону с рН 7,2-7,4 добавляют 2%-ного агара и 6,5%-ного хлористого натрия, расплавляют на водяной бане, при необходимости фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают мерным цилиндром по 100 см³ в колбы вместимостью 250 см³ и стерилизуют при 121⁰С в течение 30 минут. Получают солевой агар. Вместо МПБ можно использовать сухой питательный агар, добавив к нему 6,5% хлористого натрия.

Желточно-солевой агар. К расплавленному и охлажденному до 45⁰С солевому агару (основе) добавляют 20 см³ эмульсии яичного желтка. После полного размешивания желточно-солевой агар разливают в стерильные чашки Петри по 20 см³ и хранят в холодильнике 5-7 дней.

Для приготовления эмульсии яичного желтка на дно стерильной чашки Петри помещают куриное яйцо, которое тщательно протирают ватой, смоченной этиловым спиртом. Стерильным пинцетом пробивают с двух противоположных сторон два отверстия. Через одно из этих отверстий из яйца полностью удаляют белок, а затем, несколько увеличив отверстие, выливают желток в стерильную колбу вместимостью 200 см³. Желток добавляют в колбу с 4-мя объе-

мами стерильного физиологического раствора, затем содержимое тщательно встряхивают до получения гомогенной массы.

Молочно-солевой агар. К 100 см³ расплавленного и охлажденного до 45⁰С солевого агара вносят 10 см³ обезжиренного стерильного молока, тщательно размешивают и разливают тонким слоем в стерильные чашки Петри.

Контрольные вопросы

1. Перечислить группы микробиологических критериев безопасности молочных продуктов.
2. Какие микробиологические показатели определяют для оценки качества молочных продуктов?
3. Что такое КМАФАнМ и в каких видах молочных продуктов определяется этот показатель?
4. Почему бактерии группы кишечной палочки выбраны в качестве санитарно-показательных для молочных продуктов?
5. Какие микроорганизмы из группы условно-патогенных микроорганизмов определяют в сыре, твороге?
6. Какие патогенные микроорганизмы определяют в молоке и молочных продуктах?
7. Какие микробиологические показатели определяют для оценки микробиологической стабильности продукта?
8. Кто осуществляет микробиологический контроль на предприятиях молочной промышленности?
9. Каким оборудованием и какой посудой должна быть оснащена микробиологическая лаборатория?
10. Перечислить объекты микробиологического контроля на предприятиях молочной промышленности.
11. С какой периодичностью осуществляется микробиологический контроль готовой продукции на предприятиях молочной промышленности?
12. Каким образом готовят посуду для проведения микробиологического анализа?
13. Для чего используются накопительные питательные среды?
14. Какие питательные среды используются для определения молочнокислых бактерий в молоке и молочных продуктах?
15. Как готовятся и для чего используются плотные питательные среды?
16. Назовите питательные среды, которые используются для определения микробиологических показателей в молоке и молочных продуктах.
17. Какие питательные среды используются для выявления и идентификации бактерий группы кишечной палочки.
18. Какие питательные среды являются селективными для коагулазоположительных стафилококков? Как они готовятся?

Лабораторно-практическое занятие №6

Изучение роста микроорганизмов и влияние на него pH и температуры культивирования

Цель работы: Изучить влияние факторов внешней среды (pH среды, температуры) на развитие микроорганизмов.

Задание:

1. Сделать посев бактерий на питательных средах с различным значением pH.
2. Воздействовать на спорообразующие и неспорообразующие бактерии высокой температурой и сделать их посевы.
3. Сделать посевы плесневых грибов на питательных средах и вырастить их при различных температурах.
4. Провести оценку интенсивности роста бактерий на питательных средах с различным значением pH.
5. Повести оценку интенсивности роста бактерий после воздействия на них высокой температуры.
6. Из выросших культур приготовить мазки и окрасить их по Граму.
7. Промикроскопировать препарат и установить форму бактерий.
8. Провести оценку интенсивности роста и спорообразования плесневого гриба при различных температурах выращивания.
- 9.

Материалы и оборудование: Питательные среды: МПА, МПБ, МПЖ, Китт – Тароцци в пробирках; пробирки с бактериальной культурой для засева; бактериологические петли; стерильные пастеровские пипетки; три чашки Петри и один стерильный завернутый шпатель на двух студентов; карандаши по стеклу.

Теоретическая часть.

В естественных условиях микроорганизмы подвергаются воздействию разных по своей природе факторов, которые могут как стимулировать, так и тормозить их развитие (замедлять метаболические процессы) и даже приводить их к гибели.

Температура является одним из наиболее мощных факторов, воздействующих на микроорганизмы. И хотя в целом развитие микроорганизмов происходит в очень широком диапазоне температур, для каждого конкретного вида существуют определенные температурные границы, в которых происходит их жизнедеятельность. Эта температурная зависимость характеризуется тремя точками:

- минимальной температурой развития (t_{minimum}). Это такая температура, при незначительном снижении которой скорость роста стремится к нулю ($V_{\text{роста}} \rightarrow 0$);

- оптимальной температурой развития (t_{optimum}). Это такая температура, при которой скорость роста является максимальной ($V_{\text{роста}} = \text{max}$);

- максимальной температурой развития (t_{maximum}). Это такая температура, при незначительном увеличении которой скорость роста стремится к нулю ($V_{\text{роста}} \rightarrow 0$).

В зависимости от отношения к той или иной температуре все микроорганизмы делятся на три основные группы: психрофилы, мезофиллы, термофилы.

Психрофилы (греческое «психрос» - холод, «филео» - люблю) развиваются при низких температурах. Минимальной температурой развития у них является температура замерзания среды (около -2°C), оптимальная $-15-20^{\circ}\text{C}$, а максимальная – $30-35^{\circ}\text{C}$. К ним относятся обитатели холодных источников северных морей и океанов. Их часто обнаруживают на поверхности рыб. Многие из них, относящиеся к родам *Pseudomonas*, *Achromobacter*, способны быстро вызывать микробиальную порчу рыбы, хранящейся при температуре 0°C . К психрофилам относится большинство светящихся бактерий рода *Photobacterium*. Их развитие в морской воде вызывает ее свечение.

Мезофиллы («мезос» - средний) – наиболее распространенная группа микроорганизмов, развивающихся в температурных пределах от $5-10$ до $40-50^{\circ}\text{C}$. Температурный оптимум для них составляет $25-30^{\circ}\text{C}$. К этой группе относятся многие гнилостные бактерии, вызывающие порчу пищевых продуктов при положительных температурах, а также все патогенные и токсичные формы бактерий. Вместе с тем большинство промышленных процессов (получение органических кислот, ферментов и т.д.) осуществляется с помощью мезофиллов.

Термофилы («термос» - теплый) развиваются в температурных пределах от $30-35$ до $+80$ и даже до $+90^{\circ}\text{C}$ с оптимумом $5-60^{\circ}\text{C}$. Они присутствуют в почве, навозе, иле. Среди них есть как споровые, так и неспоровые бактерии. Наибольшее количество термофилов наблюдается в местах, постоянно испытывающих действие высоких температур (например, в горячих источниках).

Термофилия широко распространена среди анаэробов. В большинстве это споровые формы (например, представители рода *Clostridium*), причем споры у них отличаются особой термоустойчивостью. Поэтому они могут переносить стерилизацию и вызывать плоско-кислую порчу консервов.

Отрицательное воздействие на микроорганизмы оказывают как низкие, так и высокие температуры, но механизм их действия различен. Низкие температуры оказывают в основном бактериостатическое действие вследствие замедления протекания биохимических процессов (замедления метаболизма).

Гибель микроорганизмов (бактерицидное действие) наблюдается в случае чисто механического разрыва клеток образующимися в них кристаллами льда. Чем меньше образующиеся кристаллы льда и чем равномернее они распределены в клетке, тем меньше гибель микроорганизмов. И наоборот, чем крупнее кристаллы, тем больше клеток погибнет. Поэтому наиболее губительны для микроорганизмов температуры, которые соответствуют криоскопической точке цитоплазмы (от -2 до $-5,6^{\circ}\text{C}$). Чем дальше температура отстоит от криоскопического значения, тем меньше гибель микроорганизмов.

Наиболее губительны для микроорганизмов высокие температуры. Повышение температуры приводит к ускорению биохимических реакций, но ско-

рость реакций в клетке изменяется непропорционально, что приводит к дисбалансу и нарушению протекания метаболических процессов.

Высокие температуры (70-80°C и выше) оказывают бактерицидное действие. Под их воздействием происходит денатурация белка, приводящая к нарушению проницаемости клеточных стенок, потере активности ферментов, изменению структуры цитоплазмы и, как следствие всего этого, гибели клетки.

Разные группы микроорганизмов проявляют разную чувствительность к действию высоких и низких температур. Наиболее чувствительны к действию низких температур термофилы и мезофиллы, а к действию высоких – психрофилы и мезофиллы. Наибольшей устойчивостью к действию высоких температур обладают споры. Воздействие высоких температур широко используется для подавления развития микроорганизмов.

Реакция среды рН определяется концентрацией ионов водорода. Хотя в целом микроорганизмы развиваются в очень широком диапазоне, каждой физиологической группе и даже отдельным видам соответствуют определенные значения рН (оптимальная зона рН), в пределах которых происходит их развитие. Плесневые грибы, дрожжи и бактерии рода *Acetobacter* лучше всего развиваются в кислой среде при рН = 3-5. Такие микроорганизмы называются **ацидофильными**. Для большинства бактерий наиболее благоприятна нейтральная или слабощелочная среда с оптимумом рН 7,0-7,3. Изменение рН в кислую сторону губительно отражается на гнилостных бактериях. Наоборот, уксуснокислые бактерии к кислой среде устойчивы. Особенно чувствительны к изменению реакции среды азотофиксирующие бактерии, в частности азотобактер. Он лучше всего развивается при рН 7,4-7,6, поэтому в кислых почвах его практически нет. Клубеньковые бактерии тоже лучше развиваются при слабощелочной реакции среды, хотя зона рН, при которой они могут развиваться, значительно шире, чем у азотобактера.

Влияние рН на развитие микроорганизмов основано на том, что реакция среды влияет на активность ферментов, так как каждый фермент проявляет свою активность только при определенных значениях рН. От концентрации ионов водорода зависит также поступление питательных веществ внутрь клетки и физическое состояние белков. Так, денатурация и выпадение большинства белков в осадок под действием высоких температур наиболее быстро и полно происходит в слабокислой среде. Увеличение кислотности среды наряду с температурой широко используется для подавления развития микроорганизмов при консервировании пищевых продуктов.

Практическая часть

1. Провести посев бактерий на питательные среды с различным значением рН.

Посев проводят в четыре пробирки на МПА с различным значением рН: в одной из них рН равно 3, во второй – 5, в третьей – 7 и в четвертой – 9. Перед началом посева каждую пробирку подписывают: указывают значение рН и ставят свой номер.

Для посева используют бактерии или из чистой бульонной культуры, или из плотной питательной среды. Посев производят бактериальной петлей или бактериальной иглой с соблюдением правил асептики. При посева на плотную среду пользуются иглой, а на жидкую – петлей.

Петлю или иглу стерилизуют перед каждым посевом в пламени спиртовки (фламбирование). После посева пробирки с засеянными средами помещают в штатив и ставят в термостат. Термостатирование проводят в течение 24-48 ч при температуре 37°C. После этого выращенные культуры микроорганизмов переставляют в холодильник и хранят там до следующего занятия.

2. Провести посев бактерий на косо́й агар после воздействия на них высокой температуры.

Сначала готовят взвеси из культур бактерий, образующих и не образующих споры. Для этого берут две пробирки со стерильным изотоническим раствором. В одну вносят культуру сенной палочки (образует споры), а во вторую – молочнокислого стрептококка (не образует споры). Обе пробирки помещают в кипящую водяную баню на 10 мин. После кипячения пробирки охлаждают и из каждой делают посев при помощи петли на косо́й агар. Перед каждым посевом петлю стерилизуют.

Пробирки с посевами подписывают, указав культуру, которая в них посеяна, и свой номер, помещают в штатив и ставят в термостат. Посевы термостатируют 24 ч при температуре 37°C. После этого выращенные культуры переставляют в холодильник и хранят там до следующего занятия.

3. Провести выращивание плесневых грибов при разных температурах.

Посеять споры плесневого гриба в три чашки Петри на сусло-агар (СА) или среду Сабуро с агаром. Предварительно готовят водяную суспензию спор. Для этого берут культуру плесневого гриба со зрелыми органами размножения (конидиями или спорангиями) и проводят по ним бактериальной петлей, предварительно смоченной в воде (чтобы споры лучше к ней прилипали). Затем вносят петлю в стаканчик или пробирку с водой (переноса туда споры) и тщательно перемешивают. Переносить споры в пробирку можно несколько раз.

После этого стерильной бактериальной петлей берут каплю водяной суспензии спор плесневого гриба и осторожно наносят ее на СА, прикасаясь ребром петли в центр каждой чашки. При повторных посевах петлю можно не стерилизовать. Все чашки необходимо подписать, указав на каждой из них температуру выращивания, и поставить свой номер. Все надписи делаются только на дне чашек.

Засеянные чашки переворачивают вверх дном и ставят посевы на выращивание. Выращивание микроорганизмов при температурах 5°C проводят в холодильнике, а при температуре 25°C – в комнатных условиях, недалеко от батарей центрального отопления (при этом чашки надо накрыть темным материалом, чтобы не попадал свет), при 40°C – в термостате. Через 48-72 ч все чашки переставляют в холодильник и хранят там до следующего занятия.

4. Выполненные на предыдущем занятии посевы достают из холодильника и проводят их анализ.

1. Провести оценку роста бактерий на средах с различными значениями рН.

Интенсивность роста бактерий на средах с различными значениями рН определяется по степени мутности среды. Перед этим ставят содержимое каждой пробирки, на которой был проведен посев на предыдущем занятии, тщательно перемешивают (вращая пробирки между ладонями) и затем сравнивают друг с другом.

Для оценки интенсивности развития бактерий пользуются условными обозначениями: рост отсутствует (-); рост слабый (+); рост умеренный (++); рост сильный (обильный) (+++). Степень мутности оценивается визуально. Полученные данные фиксируют в таблице 1 и делают вывод о влиянии рН на развитие взятых для посева бактерий.

Таблица 1- Интенсивность развития бактерий при различных значениях рН

Название бактерий	Оценка роста при различных значениях рН			
	3	5	7	9

1. Провести оценку роста бактерий после воздействия на них высокой температуры.

Действие высоких температур на спорообразующие и неспорообразующие бактерии определяют по характеру роста микроорганизмов на косом агаре (сплошной, в виде отдельных колоний или обильный, слабый, умеренный, отсутствие роста). Полученные данные фиксируют в таблице 2 и формулируют выводы.

Таблица 2- Действие температуры на спорообразующие и неспорообразующие бактерии

№	Культура бактерий	Температура	Время действия температуры	Результаты

1. Приготовить мазки, окрасить их по Грамму и промикроскопировать.

Для распознавания изучаемых бактерий (микрококки, сарцины, бациллы и неспороносные палочки) из двух пробирок с рН 7 и нулевой концентрацией соли готовят мазки, высушивают и фиксируют их, а затем окрашивают по Грамму и микроскопируют с увеличением объектива 90х или 100х. Увиденное под микроскопом зарисовывают в тетрадь и формулируют выводы.

1. Провести оценку роста плесневого гриба, растущего при разных температурах.

Показателями влияния температуры на рост плесневых грибов служат величина колоний и интенсивность их спороношения. Для определения этих показателей чашки Петри, на которых росли грибы, переворачивают и со стороны дна чашки измеряют при помощи линейки диаметр выросших при разной тем-

пературе колоний. Полученные результаты записывают в таблицу 3 и делают выводы.

Для оценки интенсивности спороношения, как и в предыдущих опытах, пользуются следующими условными обозначениями: спороношение отсутствует (-); спороношение слабое (+); спороношение умеренное (++); спороношение сильное, или обильное (+++). Полученные данные заносят в таблицу 3 и делают выводы о влиянии различных температур на рост и спороношение плесневого гриба.

Таблица 3 - Интенсивность развития плесневого гриба при различных температурах

Родовое название гриба	Показатель интенсивности развития	Интенсивность развития при температуре		
		5°C	25 °C	40 °C
	Диаметр колоний, мм			
	Спороношение			

Вопросы для самоконтроля

1. Почему для развития микроорганизмов имеет значение концентрация вещества в питательной среде?
2. Как влияет на развитие микроорганизмов рН среды?
3. На какие группы по отношению к температуре делятся микроорганизмы?
4. Каков механизм действия на микроорганизмы высоких и низких температур?

Лабораторно-практическое занятие №7

Санитарно-гигиенический контроль условий производства

Цель работы: Ознакомиться с организацией санитарно-гигиенического контроля на предприятиях молочной промышленности. Освоить микробиологические методы, позволяющие оценить санитарное состояние воды, воздуха производственных помещений, оборудования, тары, упаковочных и вспомогательных материалов, рук и спецодежды работников.

Оборудование, материалы: термостаты, микроскопы, спиртовки, плитки, пробирки с тампонами для приготовления смывов, пробирки со средой Кесслера, средой Кода, стерильные чашки Петри, стерильные пипетки на 1 см³, стерильные колбы на 500 см³, питательные среды: мясопептонный агар, сусло-агар или среда Сабуро, бактериологические петли, предметные стекла, набор красок по Граму, фильтровальная бумага.

КРАТКИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Организация санитарно-гигиенического контроля на предприятиях молочной промышленности

Санитарно-гигиенический контроль условий производства на предприятиях пищевой промышленности осуществляется общегосударственной и ведомственными службами.

Государственный санитарный надзор осуществляется санитарно-эпидемиологической службой (СЭС) в форме предупредительного (при проектировании и строительстве) и текущего надзора за выполнением установленных для предприятий молочной промышленности санитарно-гигиенических требований. Текущий контроль может быть плановый и внеплановый.

Органы и учреждения государственного санитарного надзора наделены широкими полномочиями. Распоряжения и указания представителей санитарной службы являются обязательными для администрации предприятия. Их невыполнение несет за собой административную ответственность руководителей предприятий, цехов и отделов, отдельных работников.

Принудительные административные меры применяются и при выявлении нарушений, представляющих непосредственную угрозу для здоровья людей. В таких случаях может быть установлен запрет на дальнейшую эксплуатацию предприятия (например, запрет на выпуск продукции).

При особо серьезных нарушениях, повлекших или могущих повлечь за собой возникновение пищевых заболеваний или другие вредные последствия, органы санитарного надзора могут привлекать виновных к уголовной ответственности.

Внутриведомственный санитарный контроль осуществляют ведомственная санитарная служба и заводская лаборатория. Они контролируют выполнение требований СанПиНа для предприятий молочной промышленности, регулярно следят за санитарным состоянием производства, за профилактическими обследованиями работников цехов и соблюдением ими правил личной гигиены. Результаты проведения санитарно-гигиенического контроля фиксируются в специальном журнале.

При отборе проб для микробиологических исследований представителями санитарно-эпидемиологической службы, микробиологи предприятия также проводят отбор проб и их исследование. В случаях систематических расхождений результатов, получаемых службой СЭС и ведомственными лабораториями, проводят по согласованию совместные исследования для уточнения методов анализа и интерпретации их результатов.

Оценка санитарного состояния воздуха производственных помещений

Воздух производственных помещений может стать источником микробного загрязнения молочных продуктов.

Санитарно-гигиеническая оценка воздуха производственных помещений проводится по двум микробиологическим показателям: общей бактериальной обсемененности (КМАФАнМ) и содержанию санитарно-показательных микро-

организмов – гемолитических стрептококков и стафилококков. Воздух производственных помещений считается чистым, если КМАФАнМ не превышает 1500 КОЕ/м³, а гемолитических стрептококков и стафилококков не более 16 в 1 м³. В качестве питательных сред используют мясопептонный агар (для определения КМАФАнМ) и кровяной агар (для определения гемолитических стрептококков и стафилококков).

Для определения микроорганизмов в воздухе используют седиментационный и аспирационный методы.

Седиментационный метод основан на самопроизвольном оседании пылинок и капель вместе с микроорганизмами на поверхность плотной питательной среды в открытых чашках Петри.

Аспирационный метод заключается в принудительном оседании микроорганизмов из воздуха на поверхности плотных питательных сред. Осуществляется аспирационный метод с помощью специальных приборов (например, прибора Кротова), снабженных вентиляторами, которые засасывают воздух в прибор через клиновидную щель. В приборе воздух ударяется о поверхность плотной питательной среды в открытой чашке Петри.

Помимо нормируемых микробиологических показателей в воздухе производственных цехов и холодильниках на предприятиях молочной промышленности определяют наличие спор микроскопических грибов и дрожжей, произвольно оседающих на поверхности сусло-агара или среды Сабуро за 5 минут. Посевы культивируют при комнатной температуре в течение 5-и суток. Санитарно-гигиеническая оценка проводится по 3-х бальной шкале. Состояние воздуха отличное, если в посевах споры грибов и дрожжей не обнаружены; хорошее, если на поверхности среды оседает до 2 спор грибов, а споры дрожжей не выявлены; удовлетворительное, если в чашках Петри после культивирования вырастает не более 5-и колоний грибов и 2-х колоний дрожжей.

Для снижения бактериальной обсемененности воздуха на предприятиях молочной промышленности проводят проветривание и влажную уборку помещений. Снизить содержание микроорганизмов в воздухе можно также путем его фильтрации через воздушные фильтры, применяя физические и химические методы обеззараживания воздуха: обработку ультрафиолетовыми лучами, хлорсодержащими препаратами в виде испарений и аэрозолей. Эффективным способом является озонирование воздуха.

Оценка санитарного состояния воды

Вода, используемая на предприятиях пищевой промышленности, должна отвечать требованиям ГОСТа на питьевую воду.

Один раз в квартал при пользовании городским водопроводом и один раз в месяц при наличии собственных источников водоснабжения в воде для оценки ее санитарного состояния определяют общую бактериальную обсемененность (КМАФАнМ), содержание кишечных палочек и наличие патогенных микроорганизмов. Последний анализ выполняется службой СЭС.

Согласно требованиям ГОСТа общая бактериальная обсемененность воды не должна превышать значения 100 КОЕ/см³, коли-титр допускается не менее 300 см³, а коли-индекс – не более 3.

Коли-титр – наименьший объем воды, в котором допускается наличие одной кишечной палочки.

Коли-индекс – количество кишечных палочек в 1 дм³ воды.

Способами обеззараживания воды являются хлорирование, озонирование, обработка ультрафиолетовыми лучами.

4.1.4 Контроль оборудования, трубопроводов, посуды, инвентаря, вспомогательных и упаковочных материалов, рук работников

Контроль аппаратов и оборудования. Контроль проводят непосредственно после мойки, дезинфекции и пропаривания перед началом работы.

Для проведения исследования готовят ватные или марлевые тампоны, которые закрепляют на деревянном или металлическом стержне и помещают в пробирки с 10 см³ воды. Пробирки с тампонами стерилизуют в автоклаве при 0,1 Мпа в течение 20-30 минут. Смывы с крупного оборудования и аппаратов берут с помощью нержавеющей металлических трафаретов с вырезанной серединой (площадь выреза 10, 25 или 100 см³). Перед взятием пробы трафарет смачивают спиртом, обжигают и накладывают на исследуемую поверхность. Ограниченную поверхность промывают смоченным тампоном, затем тампон погружают в пробирку с водой и содержимое хорошо перемешивают. В смывной воде определяют общую бактериальную обсемененность и наличие кишечной палочки (путем посева на МПА и среду Кесслера). В смывах с хорошо вымытого оборудования общее количество микроорганизмов в смывной воде не должно превышать их содержания в чистой воде, поступающей на мойку. Кишечные палочки должны в смыве отсутствовать.

Наличие кишечной палочки можно определить, используя среду Кода. В этом случае тампоном, смоченным в среде Кода, промывают исследуемую поверхность. Далее тампон погружают в среду, а пробирку помещают в термостат с температурой 42⁰С на 24 часа. О наличии кишечной палочки судят по изменению цвета среды с зеленого до желтого.

Контроль трубопроводов, рукавов, шлангов. Внутренняя поверхность трубопроводов, рукавов, шлангов недоступна для взятия проб с помощью тампонов. В этом случае общую бактериальную обсемененность и коли-индекс определяют в последней промывной воде. Эти показатели не должны отличаться от показателей воды, применяемой в производстве.

Контроль посуды и инвентаря. Для анализа санитарного состояния стеклянных бутылок и банок смыв делают путем обмывания внутренней поверхности последовательно 10 единиц посуды 20 см³ воды. Санитарное состояние бочек, бидонов, цистерн проверяют путем посева последней смывной воды. Смыв с мелкого инвентаря (мешалки, пробники, термометры и др.) готовят путем смачивания всей поверхности стерильным тампоном, а при анализе санитарного состояния стеллажей, лотков, ведер, лопат пользуются трафаретом. В смывах

определяют общую бактериальную обсемененность и наличие кишечной палочки. Кишечная палочка должна отсутствовать в смывах.

Контроль вспомогательных и упаковочных материалов. Пергамент, фольгу, пленку, комбинированные материалы для упаковки молока и молочных продуктов разворачивают и с внутренней стороны берут смыв стерильным ватным тампоном (со 100 см³ поверхности). Определяют наличие микроскопических грибов и наличие кишечной палочки. Кишечная палочка в смывах должна отсутствовать, а содержание плесеней не должно превышать 5 в 1 см³ смыва.

Поваренную соль контролируют на общую бактериальную обсемененность. Для разведения берут 5 г соли и растворяют ее в 95 см³ воды. Содержание микроорганизмов в соли не должно превышать 100 КОЕ/г.

Сахар исследуют на наличие дрожжей и плесеней, растворяя 10 г сахара в 90 см³ воды. Дрожжи и микроскопические грибы должны отсутствовать.

Контроль чистоты рук и спецодежды работников. Анализ чистоты рук работников производят (без предварительного предупреждения) пред началом производственного процесса только у рабочих, которые непосредственно соприкасаются с чистым оборудованием или продукцией.

Перед анализом тампон смачивают стерильной водой или физиологическим раствором и обтирают им обе руки и пальцы каждого работника. Тампон ополаскивают в воде и всю смывную воду высевают в 5 см³ среды Кесслера или Кода. Наличие в смыве кишечной палочки недопустимо.

Периодически проводят контроль обработки рук хлорной известью, для чего отдельные участки рук протирают ватным тампоном, смоченным йодкрахмальным раствором (смесь растворов - 6% раствора йодистого калия и 4% раствора растворимого крахмала в равных соотношениях). Если тампон и поверхности рук в местах соприкосновения с тампоном окрашиваются в сине-бурый цвет, то это свидетельствует о присутствии ионов хлора.

Чистоту рук можно проверить также с помощью индикаторных бумажек для определения бактерий группы кишечной палочки. Для этого индикаторную бумажку смачивают в стерильной воде и накладывают на руку. Затем бумажку помещают в пакет, запаивают и термостатируют в течение 12 часов при 37⁰С. Появление розовых пятен свидетельствует о присутствии БГКП.

Халаты, куртки, передники, перчатки из ткани периодически исследуют на присутствие кишечных палочек посевом 1 см³-смывной воды в среду Кесслера. Кишечные палочки на спецодежде должны отсутствовать.

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1-е занятие

На первом занятии студенты знакомятся с методиками определения микроорганизмов в воздухе, воде и осуществляют посевы этих объектов на питательные среды. Готовят смывы с рук и далее проводят определение наличие кишечной палочки с использованием среды Кода.

Микробиологическое исследование воздуха

Проводят седиментационным методом.

Определяют количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) и содержание микроскопических грибов и дрожжей.

Для каждого определения готовят по 2 чашки Петри с 10-15 см³ мясопептонного агара или среды для определения КМАФАнМ и сусло-агара или среды Сабуро. Чашки переносят в исследуемое помещение и помещают на развернутую бумагу, в которой они стерилизовались. Далее сдвигают крышки на самый край бортика чашки так, чтобы вся поверхность агаризованной среды была открыта полностью.

Чашки оставляют открытыми 5, 10 или 15 минут (время экспозиции) в зависимости от загрязненности воздуха. Затем их закрывают крышками, переворачивают вверх дном и помещают в термостат. Чашки с МПА выдерживают в течение 24-48 часов при 37⁰С, а со средой Сабуро – в течение 2-3 суток при 25⁰С.

Подсчет колоний производят визуально и с помощью лупы. Подсчет колоний грибов и дрожжей ведут отдельно. Для определения содержания микроорганизмов в 1 м³ пользуются формулой, предложенной Омелянским, согласно которой на поверхности чашки в 100 см² оседает в течение 5 минут столько микроорганизмов, сколько их содержится в 10 л воздуха:

$$X = a \cdot 100 \cdot 5 \cdot 100 / ST,$$

где *a* – число выросших в чашках колоний (среднее из двух);

S – площадь чашки Петри, см²;

T – время экспозиции, мин;

100 – пересчет площади чашки на 100 см²;

5 – время экспозиции по Омелянскому;

100 – пересчет на 1 м³ воздуха.

Микробиологическое исследование воды

Отбор проб. Кран или край спускной трубы обжигают зажженным ватным тампоном, пропитанным спиртом. Открывают кран и в течение 10-15 минут воду спускают, после чего производят отбор пробы в стерильную колбу (объем пробы не менее 500 см³). Колбу закрывают ватно-марлевой пробкой над огнем.

4.2.2.1 Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) проводят по методике, описанной в разделе 2.2.2.1. Для посева отбирают 1 см³ воды.

4.2.2.2 Определение содержания колиформных бактерий методом бродильных проб

Метод бродильных проб (или титрационный метод) основан на накоплении бактерий установленного объема воды в жидкую накопительную среду, с последующим пересевом на дифференциально-диагностическую среду для идентификации выросших колоний.

Первый этап исследования заключается в посеве 3-х объемов воды по 100 см³, 3 объемов по 10 см³ и 3 объемов по 1 см³ в лактозопептонную среду. Посев 100 и 10 см³ в 10 и 1 см³ концентрированной лактозо-пептонной среды, посев 1 см³ пробы проводят в 10 см³ среды обычной концентрации. Для определения можно также использовать среду Кесслера. Посевы инкубируют при температуре 37⁰С в течение 24-48 часов. Если во всех колбах и пробирках роста кишечных палочек не обнаружено, то это значит, что коли-титр более 333 см³.

На втором этапе исследований из пробирок и колб, где отмечено наличие роста и образование газа, производят высев петлей в сектора среды Эндо. Посевы на среде Эндо выдерживают в термостате при 37⁰С в течение 18-20 часов. Отсутствие колоний, типичных для бактерий группы кишечных палочек, дает отрицательный ответ о содержании этих микроорганизмов в исследуемом объеме воды.

4.2.2.3 Определение колиформных бактерий методом мембранных фильтров

Метод основан на фильтрации установленного объема воды через мембранные фильтры, выращивании посевов на дифференциально-диагностической среде и последующей идентификации выросших колоний.

Для анализа точно отмеряют 300 см³ воды и фильтруют этот объем через стерильный мембранный фильтр. После окончания фильтрования фильтр осторожно приподнимают фламбированным пинцетом и переносят в чашку Петри со средой Эндо. Поверхность фильтра с осевшими на ней микроорганизмами должна быть обращена вверх. Чашки с фильтрами ставят в термостат дном вверх и инкубируют посевы при температуре 37⁰С в течение 24 часов.

Результат считается отрицательным, если на фильтрах вообще не выросли колонии, или выросли колонии с неровными краями и поверхностью.

При наличии типичных лактозоположительных колоний, дающих отпечаток на обратной стороне мембранного фильтра и среде – темно красных, красных с металлическим блеском, а также лактозоотрицательных – розовых без отпечатков, подсчитывают число колоний каждого типа.

Для идентификации отбирают не менее 5 колоний каждого вида и делают посев на скошенный питательный агар. Посевы инкубируют при 37⁰С в течение 16-18 часов. Далее проводят биохимические тесты с чистыми культурами: оксидазный тест и тест образования кислоты и газа при ферментации лактозы.

Исследование чистоты рук

Закрепленный на деревянном или металлическом стержне стерильный тампон смачивают стерильной водой (или физиологическим раствором) и протирают ими ладони, тыльную поверхность рук, под ногтями и между пальцами обеих рук. Тампон погружают в пробирку с водой, в которой проводилось смачивание, содержимое пробирки хорошо взбалтывают, отбирают 1 см³ и готовят разведения (1:10 и 1:100).

Для определения КМАФАнМ проводят посев разведений в чашки Петри на мясопептонный агар с последующим термостатированием при 37⁰С в течение

48 часов. Остаток смыва вместе с тампоном высевают в пробирки с 5 см³ среды Кесслера и проводят культивирование при 43⁰С в течение 24 часов.

Учет результатов исследований. Чистоту рук оценивают по количеству микроорганизмов в 1 см³ смыва при отсутствии газообразования в пробирке со средой Кесслера с поплавком (при отсутствии кишечной палочки). Состояние рук считается: отличным, если в 1 см³ смыва содержится до 1000 клеток микроорганизмов; хорошим, если содержание микроорганизмов составляет от 1000 до 5000 в 1 см³ смыва; удовлетворительным – при количестве микроорганизмов в 1 см³ смыва от 5000 до 10000. Если количество микроорганизмов в 1 см³ смыва превышает 10000 клеток, то санитарное состояние рук плохое (руки грязные).

2-е занятие

На втором занятии студенты исследуют:

- ***посевы воздуха на мясопептонном агаре и на среде Сабуро.*** Подсчитывают количество выросших колоний и по формуле Омелянского (раздел 4.2.1.) определяют количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, содержание грибов и дрожжей в 1 м³ воздуха. Определение качественного состава микрофлоры воздуха проводят по методикам, описанным в разделах 2.2.4 и 2.2.5. На основании результатов исследований делаются выводы о санитарном состоянии и качественном составе микрофлоры воздуха.

- ***Посевы водопроводной воды на мясопептонном агаре и среде Кесслера.*** Подсчитывают количество выросших колоний на мясопептонном агаре. Если в чашках выросло более 100 колоний, то санитарное состояние воды неудовлетворительное. Внимательно рассматривают посевы воды на жидкой накопительной среде (лактозо-пептонной среде или среде Кесслера). Если на среде есть рост, то лаборанты к занятию делают пересев на среду Эндо. Студенты рассматривают посевы в чашках Петри на среде Эндо и при наличии типичных колоний готовят фиксированные мазки, окрашивают их по Граму. Если в мазках при микроскопии с объективом на х90 обнаруживаются грамотрицательные мелкие палочки, располагающиеся по одиночке, без спор, то считают, что в исследуемой пробе воды присутствуют кишечные палочки и делают вывод о том, что коли-титр воды меньше объема, допустимого нормативом на питьевую воду.

Посевы с рук на мясопептонном агаре и среде Кесслера. Делают вывод о чистоте рук согласно описанию, изложенному в разделе 4.2.3.

Контрольные вопросы

- 1. Какая служба осуществляет государственный санитарный надзор на предприятиях молочной промышленности? Какие формы государственного санитарного надзора Вы знаете?***
- 2. Кто осуществляет внутриведомственный санитарный надзор на предприятиях молочной промышленности?***
- 3. По каким микробиологическим показателям проводят оценку санитарно-гигиенического состояния воздуха?***

4. В чем сущность седиментационного метода определения микроорганизмов в воздухе?
5. Каким образом можно снизить бактериальную обсемененность воздуха?
6. Какие микробиологические показатели определяются согласно ГОСТу в питьевой воде для оценки ее санитарного состояния?
7. Каким образом готовятся смывы с оборудования для оценки его санитарного состояния?
8. Как проводят контроль чистоты трубопроводов, шлангов, рукавов?
9. Какие микробиологические показатели определяют в смывах с оборудования, трубопроводов, посуды?
10. Каким образом проводят микробиологический контроль вспомогательных и упаковочных материалов?
11. Как проводят микробиологический контроль чистоты рук работников?
12. Как проводят контроль обработки рук работников хлорной известью?
13. Как определить содержание микроорганизмов в 1 м³ воздуха?
14. Что такое коли-титр, коли-индекс воды? Какими методами определяется содержание кишечных палочек в питьевой воде?
15. Какие способы обеззараживания воды Вам известны?

Лабораторно-практическое занятие № 8

Тема: **Микробиологическое исследование мяса**

Цель работы: изучение микробиологических показателей качества мяса и освоение методики исследования микрофлоры мяса.

Оборудование и материалы: микроскоп, предметные стекла, набор красок, спиртовки, стерильные ступки, пипетки, чашки Петри, песок, вода, МПА.

1 КРАТКИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Бактериологическое исследование мяса производят периодически по графику с целью контроля санитарного состояния не реже 1-го раза в 10 дней. Обязательное микробиологическое исследование мяса осуществляют в следующих случаях:

- при заболевании желудочно-кишечного тракта или дыхательных путей;
- при подозрении на инфекционное заболевание животного;
- при убое из-за травмы;
- при «вынужденном» убое;
- при убое животных-производителей.

Микробиологическое исследование мяса выполняют в соответствии с инструкцией ветеринарно-санитарного надзора. Для анализа отбирают следующие образцы: мышцы сгибателя и разгибателя конечности, часть печени, легкого, селезенку, почку, лимфатические узлы с окружающей соединительной тканью, трубчатую кость. Образцы упаковывают в стерильный материал, пломбируют и направляют в лабораторию с сопроводительным документом, в котором указы-

вают вид животного, дату и время убоя, фамилию и адрес хозяина, предполагаемый диагноз.

Анализ начинают с изучения мазков-отпечатков, окрашенных по Граму. Этот этап называют бактериоскопическим исследованием, целью которого является обнаружение возбудителей сибирской язвы и ботулизма. Выявление в мазках грамположительных палочек, расположенных в цепочках, имеющих капсулы и споры, позволяет обосновать предварительный диагноз сибирской язвы. Если в мазках обнаруживают небольшие грамположительные палочки, имеющие форму ракеток, то возникает подозрение на заражение проб возбудителем ботулизма.

Далее выполняется собственно бактериологическое исследование. Для этого отбирают навески проб массой 5 г, растирают в ступках со стерильным песком, добавляя стерильный физиологический раствор из расчета, чтобы получить разведение 1:10. После отстаивания суспензии надосадочную жидкость высевают на различные питательные среды для выделения чистых культур аэробных и анаэробных микроорганизмов. Выделенные чистые культуры подвергают дальнейшему изучению по стандартным схемам для идентификации. Целью исследования является выявление возбудителей зооантропонозных инфекций.

Определение доброкачественности мяса. Доброкачественность (свежесть) мяса оценивают по результатам органолептического, биохимического, бактериоскопического и микробиологического исследований согласно ГОСТам.

Органолептическую оценку производят по общепринятым признакам: описывают цвет, консистенцию, запах мясной и жировой ткани, характер бульона при варке.

Бактериоскопическое исследование выполняют следующим образом: готовят мазки-отпечатки с поверхности мяса, с глубины 2-2,5 см и 3-4 см, окрашивают их по Граму. В каждом мазке изучают не менее 5-ти полей зрения, в которых подсчитывают число бактерий и отмечают другие изменения.

Оценка свежести мяса представлены в таблице 1.

Таблица 1- Оценка свежести мяса

Качество мяса	pH	Бактериоскопическая картина
1. Свежее	5,6-6,2	В мазках-отпечатках микробов нет или имеются единичные бактериальные клетки на поверхности мяса
2. Пониженной свежести	6,3-6.5	В мазках-отпечатках из глубины мяса обнаруживают 20-30 кокков и единичные палочки, на поверхности - несколько десятков клеток в поле зрения. Имеются распавшиеся мышечные волокна
3. Несвежее	6,6 и выше	В мазках-отпечатках с поверхности и с глубины мяса выявляются масса клеток с преобладанием палочек, имеется множество распавшихся мышечных волокон

Свежесть мяса характеризуется также показателями общей бактериальной обсемененности в 1 г или на 1 см² поверхности.

Определение общего количества бактерий на поверхности мяса. Пробы для анализа отбирают методом срезов. Стерильным скальпелем срезают пластинку мяса толщиной 2-3 мм и взвешивают в стерильном бюксе. Навеску растирают со стерильным песком. Кашицу смывают 10 мл стерильной воды. В течение 5-ти минут смесь тщательно взбалтывают и дают отстояться. В чашки Петри высевают по 1 мл надосадочной жидкости, которую заливают расплавленным мясо-пептонным агаром и перемешивают. Посевы выращивают в термостате при температуре 37 °С в течение 2-х суток, а затем подсчитывают число выросших колоний.

При расчете бактериальной обсемененности 1 см² поверхности мяса исходят из того, что микрофлора 1 г среза соответствует 1,5 см² поверхности. Количество микроорганизмов на поверхности свежего мяса не должно превышать 100 тысяч клеток на 1 см².

Определение общего количества микроорганизмов в мясе. Пробу мяса массой 100-150 г погружают в кипящую воду на 1-2 мин, чтобы убить микроорганизмы на поверхности. Из глубины вырезают кусочки мяса массой 1-2 г, взвешивают в стерильном бюксе и растирают в ступке со стерильным песком. Кашицу смывают стерильной водой до разведения 1:10, взбалтывают и дают отстояться.

Надосадочную жидкость в количестве 1,0 и 0,1 мл высевают в чашки Петри и заливают расплавленным мясопептонным агаром с температурой 45-50 °С. Материал и среду перемешивают путем покачивания чашек. После застывания агара чашки помещают на 1-2 суток в термостат при температуре 37 °С, затем подсчитывают число выросших колоний. Для определения общего количества бактерий число колоний в чашках умножают на степень разбавления исходного материала. В свежем мясе хорошего качества бактериальная обсемененность не должна превышать 100 тысяч клеток в 1 г.

2 ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1. Произвести исследование доброкачественности мяса органолептическим, бактериоскопическим и бактериологическим методами.

2. Результаты исследований оформить в тетрадях и сделать заключение о доброкачественности мяса.

Контрольные вопросы

1. В каких случаях производят обязательное микробиологическое исследование мяса и какова его цель?

2. Из каких этапов состоит микробиологическое исследование мяса?

3. Как выполняют бактериоскопическое исследование мяса и с какой целью?

4. Как определяют количество микроорганизмов в мясе и на его поверхности?

5. Какими методами оценивают доброкачественность мяса?

6. По каким показателям оценивают доброкачественность мяса?

Лабораторно-практическое занятие № 9

Тема: Микробиологическое исследование сырого и пастеризованного молока

Цель занятия: Знакомство с косвенными методами определения микроорганизмов и ингибирующих веществ в сыром молоке.

Освоение методов количественного учета микроорганизмов в питьевом молоке. Анализ полученных данных и оценка качества питьевого молока в соответствии с требованиями «Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащих санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)». Изучение качественного состава микрофлоры пастеризованного молока.

2.1 КРАТКИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

2.1.1 Отбор проб молока

Молоко для микробиологического анализа тщательно перемешивают. Стерильным черпаком или пробоотборником отбирают около 50 см³ молока в стерильную колбу, которую затем закрывают ватно-марлевой пробкой. Если пробы предназначены для отправки в лабораторию, их необходимо охладить до 5...6⁰С. Хранить пробы при этой температуре можно не более 4 часов. Перед отправкой образцы пломбируют или опечатывают, оформляют сопроводительный документ, в котором указывают дату, час отбора пробы, температуру продукта, должность и подпись бравшего пробу.

2.1.2 Методы исследования сырого молока

Основными источниками попадания микроорганизмов в молоко являются вымя и кожный покров животных, руки доярок, оборудование, воздух и др. После доения молоко необходимо охладить до возможно более низких температур во избежание чрезмерного развития микроорганизмов в молоке в процессе его хранения.

Во время хранения молока изменяется количественный и качественный состав микрофлоры. Характер этих изменений зависит от температуры, продолжительности хранения, степени обсемененности и состава микрофлоры молока. Изменение вторичной микрофлоры проходит через определенные естественные фазы развития: бактерицидную фазу, фазу смешанной микрофлоры, фазу молочнокислых бактерий, фазу дрожжей и плесеней.

Основными факторами, определяющими гигиеническое качество сырого молока являются:

- **Содержание патогенных микроорганизмов** (микобактерий туберкулеза, бруцелл, сальмонелл, энтеропатогенных кишечных палочек, дизентерийных палочек (шигелл Зонне), коагулазоположительных стафилококков). При установлении эффективности пастеризации молока ориентируются на то, что допустимое максимальное количество этих микроорганизмов в сыром молоке должно быть не выше 10...100 клеток в 1 см³.

- **Содержание сапрофитных микроорганизмов.** В зависимости от количества микроорганизмов в молоке судят о пригодности его для переработки в различные молочные продукты. Например, при переработке сырого молока в питьевое количество микроорганизмов в сыром молоке допускается до 1x10⁶ клеток в 1 см³. Повышенное содержание сапрофитных микроорганизмов приводит к различным порокам сырого молока (ослизнению и тягучести, преждевременному свертыванию, горькому, прогорклому, мыльному и щелочному вкусу, несвойственным молоку запахам, порокам цвета и т.д.).

- **Содержание соматических клеток.** При воспалительных заболеваниях молочной железы в молоке появляется большое количество соматических клеток (например, лейкоцитов). Чем больше соматических клеток в молоке, тем выше содержание в нем возбудителей маститов (патогенных стафилококков, гемолитических стрептококков и т.д.).

- **Содержание ингибирующих веществ.** Ингибирующие вещества, содержащиеся в молоке, делятся на *естественные* (собственно молочные ингибиторы, обуславливающие бактерицидные свойства молока) и *попадающие в молоко извне* (попадают в молоко при лечении, кормлении животных, с оборудования). К естественным ингибиторам относятся лизоцимы, а к ингибиторам второй группы – антибиотики, сульфаниламиды, пестициды, гербициды, остатки моюще-дезинфицирующих веществ.

Поступающее на переработку сырое молоко и сливки исследуют по **редуктазной пробе**. Этот метод относится к **косвенным методам** определения количества бактерий в молоке. Метод основан на восстановлении метиленового голубого или резазурина при 38⁰С окислительно-восстановительными ферментами, выделяемыми в молоко микроорганизмами. Чем дольше обесцвечиваются красители, тем выше класс молока (см. приложение 2).

К косвенным методам относится также определение **ингибирующих веществ** в сыром молоке. В качестве контроля используют образец с индикаторами, как и в редуктазной пробе. Опытным служит вариант с внесением метиленового голубого или резазурина и термофильного стрептококка. Если в молоке имеются ингибирующие вещества, то термофильные стрептококки в нем не размножаются, индикаторы не обесцвечиваются и молоко остается окрашенным (голубая окраска при использовании метиленового голубого и синевфиолетовая – при использовании резазурина).

Редуктазную пробу и определение ингибирующих веществ, а сыром молоке проводят не реже 1 раза в 10 дней.

Содержание микроорганизмов в молоке можно также определять **прямыми методами**: посевом разведений молока на МПА непосредственно (при определении КМАФАнМ) и после пастеризации при 80...85⁰С в течение 15-20 минут (для определения спор бактерий).

2.1.3 Микрофлора и методы количественного учета микроорганизмов в пастеризованном (питьевом) молоке

Поступившее на предприятие молоко подвергается различным технологическим приемам, направленным на уменьшение в нем содержания микроорганизмов. Наиболее часто используют очистку молока, охлаждение. Пастеризацию

Пастеризация – это тепловая обработка молока при температурах ниже температуры кипения. При производстве питьевого молока наиболее распространенным режимом является пастеризация при 76⁰С с выдержкой 20 секунд. Целью пастеризации является уничтожение патогенных микроорганизмов, а также инаktivация ферментов, снижающих стойкость молока и вызывающих в дальнейшем пороки молочных продуктов. Эффективность пастеризации молока зависит от температуры, продолжительности пастеризации, степени бактериальной обсемененности молока и качественного состава микрофлоры.

Микрофлору, которая остается после пастеризации молока называется **остаточной микрофлорой** пастеризованного молока. Эффективность пастеризации является высокой, если количество оставшихся бактерий составляет 0.01% от исходного содержания бактерий в молоке и низкой – при 1,5-2%. Сразу после пастеризации БГКП не допускаются в 10 см³ молока. В остаточной микрофлоре молока сразу после пастеризации содержатся в основном споровые формы бактерий. После пастеризации молоко может дополнительно обсеменяться БГКП, психрофильными бактериями, мезофильными молочнокислыми стрептококками, термоустойчивыми палочками, дрожжами, уксуснокислыми бактериями (**микрофлора вторичного обсеменения** пастеризованного молока).

В питьевом молоке выборочно от одной-двух партий не реже 1 раза в 5 дней определяют общую бактериальную обсемененность (КМАФАнМ) и наличие БГКП. По микробиологическим показателям питьевое молоко и сливки должны соответствовать требованиям ГОСТа, представленного в таблице приложения 3.

2.2 ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1-е занятие

На первом занятии студенты знакомятся с правилами отбора проб молока, с факторами, определяющими гигиеническое качество сырого молока, с косвенными методиками определения в сыром молоке количества микроорганизмов и ингибирующих веществ; готовят разведения питьевого молока и проводят посев этих разведений на плотные и жидкие питательные среды для определения микробиологических показателей. В питьевом молоке прямыми методами определяют количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), наличие БГКП (эти показатели в

питьевом молоке нормируются), а также содержание микроскопических грибов и дрожжей, гнилостных бактерий для прогнозирования изменения качества питьевого молока в процессе хранения.

2.2.1 Схема разведения молока и проведения микробиологического исследования

Для приготовления разведений продукта используют пробирки с 9 см^3 стерильной воды. Иногда для приготовления разведений используются стерильные растворы разбавленного фосфатного буфера, изотонического раствора хлорида натрия, пептонной воды или лимоннокислого натрия. В первую пробирку стерильной пипеткой вносят 1 см^3 молока. Новой стерильной пипеткой тщательно перемешивают содержимое пробирки (разведение 1:10). Затем этой же пипеткой из пробирки с разведением 1:10 отбирают 1 см^3 жидкости и переносят во вторую пробирку с водой (разведение 1:100). Количество разведений рассчитывают таким образом, чтобы в чашках Петри выросло от 30 до 300 колоний. Так. При исследовании пастеризованного молока рекомендуется готовить I, II и III разведение продукта, так как нормируемое значение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в питьевом молоке не более 50...200 тыс. КОЕ/ см^3 (см. приложение 3).

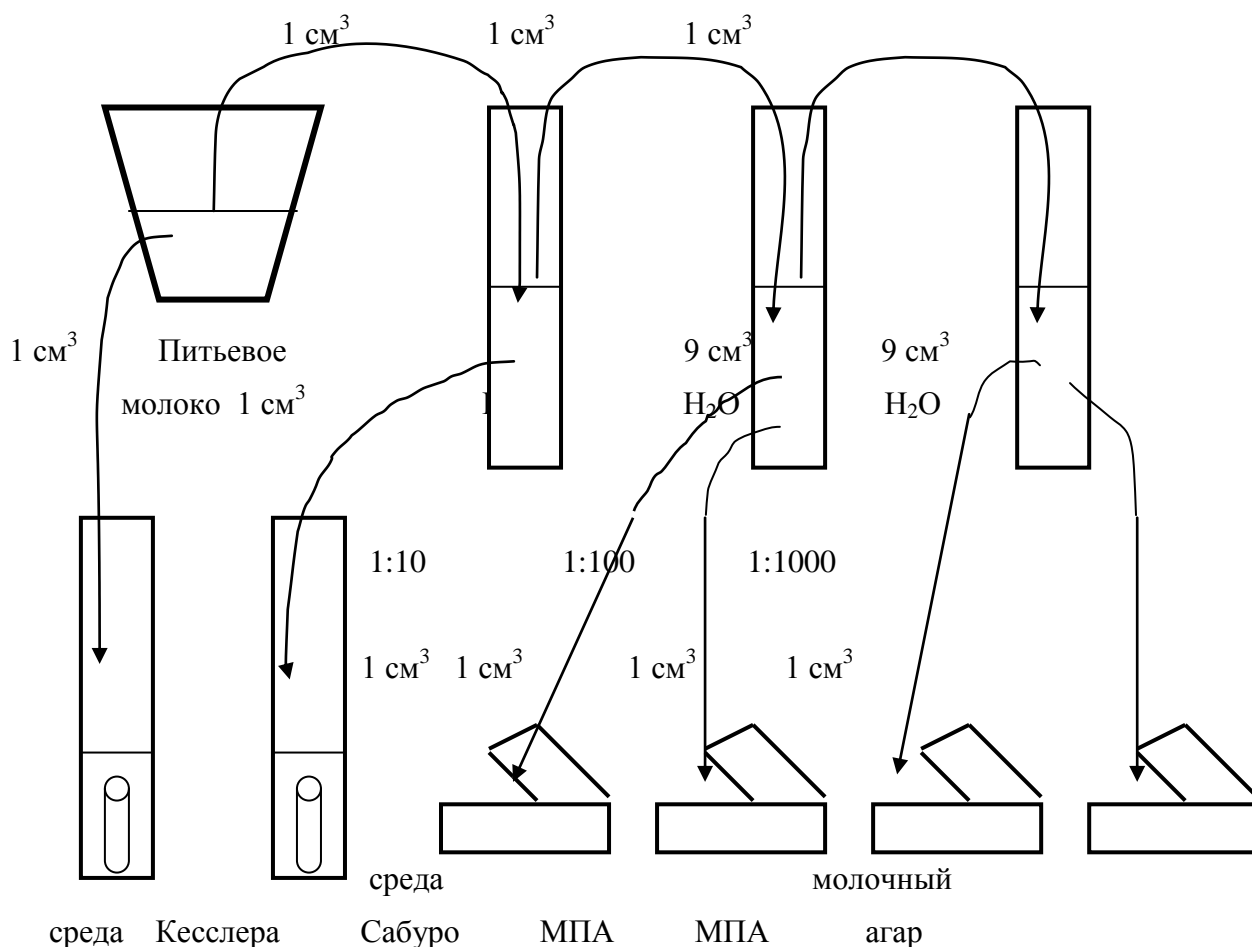


Рис.1 Схема проведения микробиологического исследования питьевого молока

2.2.2 Чашечные методы количественного учета микроорганизмов

Сущность чашечных методов количественного учета микроорганизмов заключается в посеве разведений продукта на стерильные плотные питательные среды в чашки Петри с последующим культивированием и подсчетом выросших в чашках колоний. При этом считается, что каждая колония является результатом размножения одной клетки.

Учет результатов при использовании чашечных методов

Количество выросших колоний подсчитывают в каждой чашке, поместив ее вверх дном на темном фоне, пользуясь лупой с увеличением от 4 до 10 раз. При большом количестве колоний и равномерном их распределении дно чашки делят на сектора, подсчитывают число колоний в 2-3 секторах, находят среднеарифметическое число колоний и умножают на разведение (10 – при первом разведении продукта, 100 – при втором разведении и т.д.).

Если инкубированные чашки с первым разведением (1:10) не содержат колоний, то результат выражают так: меньше 1×10 КОЕ/см³ (КОЕ – колониеобразующие единицы);

Если в чашках Петри с I разведением (1:10) содержится меньше, чем 15 колоний, то результат выражается так: количество микроорганизмов менее $M \times 10$ КОЕ/г, где М – число выросших колоний;

Если количество колоний более 15, то подсчитывают количество колоний в чашках, умножают на разведение и полученный результат округляют в соответствии с ГОСТом 26670-91 «Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов»:

- до числа, кратного 5, если количество колоний в чашке менее 100;
- до числа, кратного 10, если количество колоний в чашке более 100.

Пример: Посеяно I разведение продукта 1:10. В чашке Петри выросло 194 колонии. Полученный результат округляем до 200.

Количество микроорганизмов в продукте: $200 \times 10 = 2,0 \times 10^3$ КОЕ/г.

Чашечными методами определяют следующие микробиологические показатели: КМАФАнМ, количество спор грибов и дрожжей, содержание гнилостных бактерий, коагулазоположительных стафилококков.

2.2.2.1 *Определение мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов*

Перед посевом чашки маркируют.

По 1 см³ разведений (III и II разведений молока) вносят в чашки Петри. Пипетку с посевным материалом держат под углом 45⁰С, касаясь концом пипетки дна чашки. Затем в каждую чашку наливают по 12-15 см³ мясопептонного агара или среды для определения количества мезофильных аэробных и фа-

культативно-анаэробных микроорганизмов, расплавленной и охлажденной до 45⁰С. Сразу после заливки агара содержимое тщательно перемешивают путем легкого вращательного покачивания для равномерного распределения посевного материала. Если ожидают ползучий рост микроорганизмов посевы после застывания агара заливают вторым слоем питательной среды или 3...5 см³ водного раствора агара. После застывания среды чашки Петри переворачивают крышками вниз и помещают в термостат при (30±1)⁰С на 72 часа (допускается предварительный учет через 48 часов с последующим окончательным учетом через 24 часа).

2.2.2.2 *Определение количества грибов и дрожжей*

Ведут так же, как и определение КМАФАнМ, только в качестве питательной среды используют сусло-агар или среду Сабуро. Для посева берут II разведение молока. Инкубацию посевов ведут при температуре 24⁰С в течение 5 суток с предварительным учетом через 3 суток.

2.2.2.3 *Определение протеолитических (гнилостных) бактерий*

III разведение молока засевают на молочный агар инкубацию посевов проводят при 30⁰С в течение 72 часов. Протеолитические бактерии на молочном агаре при своем росте образуют зоны просветления агара (зоны протеолиза). Пептонизирующие бактерии образуют узкие зоны пептинизации.

2.2.3 *Методы, основанные на накоплении микроорганизмов с последующей их идентификацией*

Эти методы используются для выявления микроорганизмов, содержание которых незначительно в сравнении с общим количеством микроорганизмов. Сущность этих методов заключается в посеве продукта или его разведений на накопительные жидкие среды. Если после культивирования обнаруживают рост микроорганизмов (образование осадка, помутнение среды, накопление газа в поплавках), то в дальнейшем проводят пересев из пробирок, в которых замечен рост на дифференциально-диагностические среды для идентификации выросших на накопительной среде микроорганизмов.

К таким методам относятся определение наличия БГКП, сальмонелл.

2.2.3.1 *Определение бактерий группы кишечной палочки*

Для посева используют то количество продукта, в котором предусматривается отсутствие БГКП (1 см³ молока или 1 см³ первого разведения молока). Посев проводят в пробирки со средой Кесслера с поплавками. Посевы помещают в термостат с температурой 37⁰С на 24 часа.

При отсутствии признаков роста (газообразования в поплавках, помутнения среды) дают заключение об отсутствии БГКП и соответствии исследуемого продукта нормативу на БГКП.

При положительной бродильной пробе для окончательного заключения о наличии в продуктах БГКП из подозрительных пробирок производят посев на

чашки со средой Эндо или Левина. Посев производят петлей из каждой пробирки так, чтобы получить рост изолированных колоний. Чашки помещают в термостат.

Учет результатов. При отсутствии на среде Эндо или Левина колоний, типичных для БГКП (на среде Эндо – красных с металлическим блеском, на среде Левина – черных с металлическим блеском, темных с черным центром, сиреневых с темным центром) считают, что продукт соответствует нормативу. При наличии на среде Эндо или Левина типичных колоний их окрашивают по Граму и микроскопируют. Обнаружение грамтрицательных, не содержащих спор палочек указывает на наличие БГКП в анализируемой пробе и несоответствии продукта по микробиологическому нормативу.

2-е занятие

На втором занятии студенты исследуют посевы разведений молока, подсчитывают количество выросших колоний в чашках Петри на мясопептонном агаре или среде для определения мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, среде Сабуро, молочном агаре. Учет результатов при использовании чашечных методов ведут согласно п. 2.2.2. Данные, полученные при посеве разведений молока на МПА или среде для определения КМАФАнМ, сравнивают с нормируемым значением, пользуясь приложением 3.

Изучают посевы молока и его разведения (1:10) в пробирках со средой Кесслера и поплавками. Если в пробирках со средой Кесслера газообразования в поплавках не наблюдается, то делают заключение об отсутствии БГКП во взятом на анализ объеме молока (1 или 0,1 см³).

По результатам исследований студенты делают вывод о качестве исследованного молока.

Качественный состав микрофлоры пастеризованного молока определяют, изучая культуральные и морфологические свойства выросших в чашках колоний бактерий.

2.2.4 Изучение культуральных свойств выросших в чашках колоний

Чашки с посевами внимательно осматривают. Отмечают колонии микроорганизмов, отличающиеся по культуральным свойствам.

Рассматривая выросшие колонии в проходящем свете невооруженным глазом (макроскопически) и с помощью лупы описывают следующее:

2. Форму колоний

Форма колоний может быть круглой, неправильной, корневидной, эллипсоидной и т.д.

3. Размеры колоний

Колонии, имеющие диаметр более 4 мм являются крупными, от 2 до 4 мм – средними, от 1 до 2 мм – мелкими, менее 1 мм - точечными или росинчатыми.

4. Цвет колоний

Микроорганизмы, содержащие пигменты могут быть желтого, оранжевого, розового, кремового и др. цветов. Большинство микроорганизмов не содер-

жат пигментов и растут на плотных средах в виде серовато-матовых колоний. Такие колонии называют бесцветными.

5. Рельеф колоний

Рельеф или профиль колоний может быть плоским, выпуклым, куполообразным, смешанным (плоским с выпуклым центром, кратерообразным и др.).

5. Поверхность колоний

Поверхность колоний может быть гладкой, блестящей, шероховатой, морщинистой, извилистой и т.д.

6. Прозрачность колоний

Колонии бывают прозрачные, полупрозрачные и непрозрачные.

7. Характер края колоний

Край может быть ровным, волнистым, локонообразным, лопастным, бахромчатым, зазубренным, корневидным и т.д.

8. Структуру колоний

Структура колоний бывает однородная (гомогенная) и неоднородная (гетерогенная). Неоднородные колонии могут быть мелко- и крупнозернистыми, радиально или концентрически исчерченными, чешуйчатыми и др.

9. Консистенцию колоний

Определяется при приготовлении препаратов для микроскопического анализа.

2.2.5 Изучение морфологических свойств микроорганизмов

При изучении морфологии выросших в чашках колоний на предметных стеклах готовят фиксированные мазки (при исследовании колоний одноклеточных микроорганизмов: бактерий, дрожжей) или препараты типа «раздавленная капля» (при исследовании колоний микроскопических грибов).

Фиксированные мазки окрашивают по Граму и микроскопируют с использованием иммерсионного объектива (на х90). При микроскопировании препаратов обращают внимание на форму клеток; их взаимное расположение; наличие спор; отношение к окраске по Граму (грамположительные бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет, а грамотрицательные – в розовый). Эти признаки позволяют отнести микроорганизмы к определенной группе.

Техника окраски по Граму

1. На фиксированный мазок помещают фильтровальную бумагу с генцианвиолетом и смачивают ее водой. Окраску мазка генцианвиолетом проводят в течение 2...3 минут;

2. Бумагу снимают с мазка и обрабатывают мазок раствором Люголя в течение 1...2 минут;

3. Раствор Люголя сливают и на мазок наносят несколько капель 96% спирта на 30...60 секунд;

4. Мазок промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой;

5. Мазок окрашивают раствором фуксина 2 – 3 минуты, промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой. На сухой окрашенный мазок наносят каплю иммерсионного масла.

При микроскопии препаратов типа «раздавленная капля» используют сухие объективы на х8 и на х40. Обращают внимание на строение мицелия (септированный, несептированный), строение плодоносящих гифов (спорангиеносцев и конидиеносцев).

Микроскопическую картину зарисовывают.

Результаты исследований вносят в таблицу:

Таблица 1. Культуральные и морфологические признаки выросших в чашках колоний

Культуральные Свойства	Питательные среды					
	МПА		Среда Сабуро		Молочный агар	
	1	2...	1	2...	1	2...
1. Форма колоний						
2. Размеры колоний						
3. Цвет колоний						
.						
.						
.						
9. Консистенция						
Микроскопическая картина						

После заполнения таблицы делается вывод о качественном составе микрофлоры питьевого молока.

Контрольные вопросы

1. Перечислить факторы, определяющие гигиеническое качество сырого молока.
2. В чем сущность метода определения количества микроорганизмов по редуктазной пробе?
4. Как определяется эффективность пастеризации молока?
5. Какие микробиологические показатели определяют при оценке качества питьевого молока?
6. В чем сущность чашечных методов? Перечислить микробиологические показатели, которые определяются чашечными методами.
7. Как готовят разведения молока для проведения микробиологического анализа?
8. Как проводят определение КМАФАнМ, количества грибов и дрожжей?
9. В чем сущность метода определения БГКП? Какие питательные среды используются в этом методе?
10. Какие культуральные признаки определяют при изучении выросших в чашках колоний?

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология: учебник для студентов вузов. – М.: Издательский центр «Академия», 2012. – 384с.
2. Жарикова Г.Г. Микробиология продовольственных товаров. Санитария и гигиена. Учебник для вузов. / Г.Г.Жарикова – М.: Издательский центр «Академия». – 2008. – 304 с. – Библиогр.: с. 301. 5100 экз. – ISBN 5-7695-1657-7.
3. Г.Г. Жарикова, И.Б.Леонова. Основы микробиологии. Практикум. – М.: Издательский центр «Академия». – 2008. – с. – Библиогр.: с. 2000 экз. – ISBN 978 – 5 -7695 – 3472 - 0.
4. Жарикова Г.Г., Леонова И.Б. «Патогенные микроорганизмы и вызываемые ими пищевые заболевания» Учебно-методическое пособие. М.: Изд-во РЭА., 2006 г.
6. Жарикова Г.Г. «История развития пищевой микробиологии РЭА им. Г.В.Плеханова в лицах (1907 – 2007)». М.: Изд-во РЭА., 2007 г.
7. Заварзин Г.А., Колотилова Н.Н. «Введение в природоведческую микробиологию». Университет. «Книжный дом». М. 2001 г.
8. Гарибова Л.В., Лекомцева С.Н. «Основы микологии». Товарищество научных изданий КМК. М. 2005 г.
9. Мюллер Э., Леффлер В. «Микология». М.: Мир. 1995., пер. с нем.
10. Педенко А.И., Лерина И.В., Белицкий Б.И. «Гигиена и санитария общественного питания». М. «Экономика», 2009 г.
11. Шлегель Г.Г. Общая микробиология. М.: Мир, 2007., пер. с нем.
12. Шлегель Г.Г. История микробиологии: Пер. с нем.-М.: Изд-во УРСС, 2002.- 304с.
13. Мухутдинова С.М., Леонова И.Б., Жарикова Г.Г. «Словарь микробиологических терминов» М. РЭА, 2005 г.
14. Коротяев А.И., Бабичев С.А. «Медицинская микробиология, иммунология и вирусология» Санкт-Петербург. Спецлит 2002 г.
15. Единые санитарные требования Таможенного союза, утвержденные Решением Комиссии Таможенного союза от 28 мая 2010 г. N 299, 352 с.
16. Кафедральная база НТД.
17. МР2.3.2.2327-28 по организации производственного микробиологического контроля на предприятиях молочной промышленности (с атласом значимых микроорганизмов).
18. ГОСТ Р 53430-2009 «Молоко и продукты переработки молока. Методы микробиологического анализа,-2009г. – Утвержден и введен в действие 27.10.2009. №520-ст. Стандартиформ. Москва

Н.Х. КУРЬЯНОВА

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ
по дисциплине
«МИКРОБИОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ И ГИГИЕНА»