

**БЕЛКООПСОЮЗ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ  
«БЕЛОРУССКИЙ ТОРГОВО-ЭКОНОМИЧЕСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ ПОТРЕБИТЕЛЬСКОЙ КООПЕРАЦИИ»**

---

Кафедра товароведения продовольственных товаров

## **МИКРОБИОЛОГИЯ**

**Практикум  
к лабораторным занятиям  
для студентов специальности 1-25 01 09  
«Товароведение и экспертиза товаров»  
специализации 1-25 01 09 01 «Товароведение  
и экспертиза продовольственных товаров»**

Гомель 2008

УДК 579  
ББК 36-1  
М 59

Авторы-составители: И. Ю. Ухарцева, канд. техн. наук, доцент;  
В. М. Гулевич, ст. преподаватель;  
Е. Г. Тюлькова, ассистент

Рецензенты: Л. А. Суржик, начальник сектора по качеству  
и сертификации Гомельского облпотребсоюза;  
Ж. Н. Косая, ст. преподаватель кафедры  
продовольственных товаров Белорусского торгово-  
экономического университета потребительской  
кооперации

Рекомендован к изданию научно-методическим советом учреждения образования «Белорусский торгово-экономический университет потребительской кооперации». Протокол № 2 от 11 декабря 2007 г.

М 59 **Микробиология** : практикум к лабораторным занятиям для студентов специальности 1-25 01 09 «Товароведение и экспертиза товаров» специализации 1-25 01 09 01 «Товароведение и экспертиза продовольственных товаров» / авт.-сост. : И. Ю. Ухарцева, В. М. Гулевич, Е. Г. Тюлькова. – Гомель : учреждение образования «Белорусский торгово-экономический университет потребительской кооперации», 2008. – 100 с.  
ISBN 978-985-461-561-5

УДК 579  
ББК 36-1

ISBN 978-985-461-561-5

© Учреждение образования «Белорусский торгово-экономический университет потребительской кооперации», 2008

## **ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА**

Практикум по микробиологии составлен в соответствии с действующими учебной программой и учебным планом.

Цель практикума – помочь студентам в овладении теоретическими основами курса микробиологии, включая санитарии и гигиену в торговле путем изучения основных групп микроорганизмов, участвующих в производстве пищевых продуктов и влияющих на их качество в процессе хранения, а также ознакомиться с содержанием и основными методами микробиологии, позволяющими определить доброкачественность продуктов питания.

По каждому занятию приводится перечень изучаемых вопросов, задание для самостоятельной подготовки, методические указания по выполнению отдельных работ, задания для работы в лаборатории.

В приложении указаны рецепты основных питательных сред.

Прежде чем приступать к лабораторной работе, необходимо ознакомиться с правилами по технике безопасности, рекомендациями по ведению лабораторного журнала и составлению отчета.

Во время лабораторных занятий производится работа с приборами и рассматриваются причины тех или иных результатов эксперимента. Результаты опытов записываются в лабораторном журнале, делаются выводы по всем вопросам, поставленным в тексте задания.

Вся работа в целом должна быть завершена во время лабораторного занятия.

В конце занятия необходимо убрать свое рабочее место, показать преподавателю рабочий журнал с выполненным заданием для проверки.

Выполнение лабораторных работ предполагает получение новых для студента знаний, приобретение навыков экспериментальной работы и объяснение результатов.

Обладая даже небольшим запасом знаний, можно найти свое собственное оригинальное решение какой-либо проблемы.

При оценке результата вашей работы будет учитываться следующее:

1. Теоретическая подготовка к лабораторному занятию.
2. Качество выполнения лабораторного задания (аккуратность, чистота рабочего места, использование надлежащего оборудования, соблюдение правил техники безопасности, работа с прибором в соответствии с инструкцией, поведение в лаборатории и т. п.).
3. Непрерывная запись в рабочем журнале хода эксперимента и предварительных выводов.
4. Отчет о проделанной работе (аккуратность записей, разборчивый почерк, грамматические и орфографические ошибки и т. п.).

Оценка, которая выставляется по результатам работы за семестр, учитывается на экзамене.

К экзамену допускаются только те студенты, которые выполнили и сдали все лабораторные работы. Лабораторный журнал обязательно предъявляется экзаменатору, без него экзамен не принимается.

### **ТЕМАТИКА ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ**

Тема	Количество часов
1. Устройство и оборудование микробиологической лаборатории. Техника микроскопирования и культивирования микроорганизмов	4
2. Морфология совершенных и несовершенных грибов. Получение накопительных культур протей, сенной и картофельной палочек	4
3. Морфология бактерий. Изучение культурально-морфологических свойств накопительных культур. Получение чистых культур микроорганизмов	4
4. Определение родовой принадлежности по культуральным и морфологическим признакам выделенных в чистую культуру микроорганизмов	4
5. Изучение болезней плодов и овощей, продуктов их переработки, вызываемых микроорганизмами	4
6. Изучение микрофлоры молока и молочных продуктов	4
7. Определение качества мяса, мясных продуктов, рыбы и рыбных продуктов по микробиологическим показателям	4
8. Микробиологическое исследование муки и хлебобулочных изделий	2
9. Санитарно-микробиологические исследования на предприятиях общественного питания и в организациях торговли	2
Итого	32

**ЗАДАНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ  
И МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ИХ ВЫПОЛНЕНИЮ**

**Работа 1. УСТРОЙСТВО И ОБОРУДОВАНИЕ  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ.  
ТЕХНИКА МИКРОСКОПИРОВАНИЯ  
И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ**

**Цель работы:** ознакомиться с назначением микробиологической лаборатории, ее оборудования; освоить технику микроскопирования микробиологических препаратов, окраски; ознакомиться со свойствами и классификацией питательных сред, методами стерилизации и выращивания микроорганизмов в лабораторных условиях.

***Материальное обеспечение***

1. Вода.
2. Чашки Петри.
3. Пептон.
4. Агар-агар.
5. Сушильный шкаф.
6. Автоклав.
7. Микроскопы биологические иммерсионные.
8. Предметные и покровные стекла.
9. Петледержатели.
10. Спиртовки, спички.
11. Фильтровальная бумага.
12. Набор красок по Граму.
13. Раствор метиленового синего или фуксина.
14. Раствор йода.
15. Препараты готовых бактерий.
16. Ванночки с мостиками для окрашивания препаратов.

**Задание 1. Изучение устройства и оборудования  
микробиологической лаборатории.  
Устройство биологического микроскопа  
и правила работы с ним**

Микробиологические лаборатории служат для исследования микроорганизмов. Материалом для изучения могут быть пищевые продукты, пробы почвы, воды, смывы с различных объектов, выделения человека и др. Целью исследований является определение состава и свойств микрофлоры различных объектов, а также выращивание и селекция полезных видов микроорганизмов для производственных целей.

В состав микробиологической лаборатории входят помещения для проведения бактериологических исследований, бокс для проведения работ в стерильных условиях, комната для приготовления и хранения питательных сред и оборудование для их стерилизации, помещение для мойки посуды с необходимыми дезинфицирующими средствами (1%-ный раствор хлорамина, 3–5%-ный раствор фенола).

***Правила работы в учебной лаборатории***

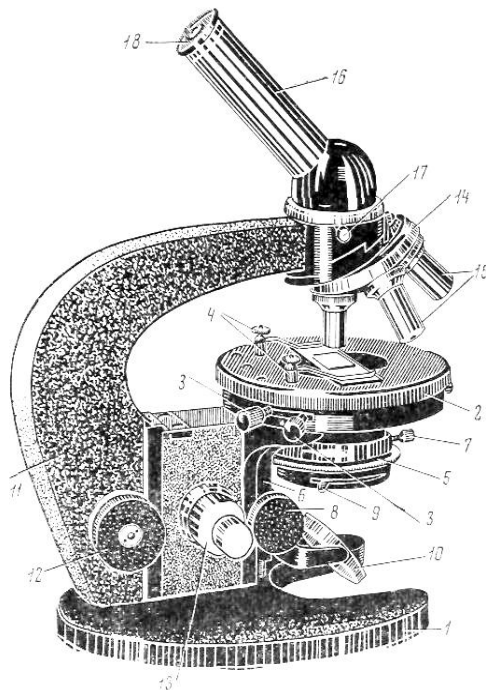
1. Не входите в лабораторию в пальто, головном уборе, не вносите посторонние вещи.
2. Приступайте к занятиям, только надев хлопчатобумажный халат.
3. Строго соблюдайте правила обращения с химическими реактивами и красителями.
4. С большой осторожностью пользуйтесь смесью спирта с эфиром, не переносите ее на столы с горелками.
5. Поскольку некоторые микроорганизмы, особенно споры грибов, являются аллергенами, не допускайте их распыления (не оставляйте открытыми чашки Петри, пробирки, колбы с культурами микроорганизмов).
6. Перед тем, как набирать ртом с помощью пипетки суспензии микроорганизмов или реактивы, убедитесь в том, что пипетка закрыта с тупого конца ватой.
7. В лаборатории поддерживайте порядок и чистоту. По окончании занятий протирайте иммерсионный объектив микроскопа мягкой тканью, накрывайте микроскоп полиэтиленовым чехлом, приведите в порядок рабочее место, вымойте руки.
8. Помните о том, что студенты несут ответственность за используемые ими микроскопы, другое лабо-

раторное оборудование, чистоту рабочего места.

9. Перед уходом из лаборатории дежурному следует проверить, выключены ли газ, вода, электроприборы.

### *Устройство биологического микроскопа*

Размеры микроорганизмов не позволяют рассмотреть их невооруженным глазом, поэтому для их исследования используют специальные оптические приборы – микроскопы (рис. 1).



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

В лабораторной практике в учебных целях для исследования микроскопических объектов наиболее широко применяют биологические иммерсионные микроскопы. Такие микроскопы позволяют получить действительное увеличенное обратное изображение предмета в проходящем свете.

Наиболее распространенными биологическими иммерсионными микроскопами являются микроскопы серии «Биолам» с увеличением объекта до 1800 раз.

В микроскопе различают две части: механическую и оптическую.

*Механическая часть* включает следующие элементы:

- Штатив, состоящий из основания микроскопа, ножки и тубусодержателя.
- Предметный столик с двумя клеммами для закрепления исследуемого препарата.
- Тубус, который передвигается вверх и вниз с помощью макрометрического винта, служащего для грубой настройки, и микрометрического винта – для точной фокусировки объекта.
- Револьверный механизм с 3–4 гнездами в нижней части для ввинчивания объективов. Объектив точно фиксируется под тубусом защелкивающей пружиной.

*Оптическая часть* включает следующие устройства:

- Осветительный аппарат, состоящий из зеркала, ирис-диафрагмы и конденсора. Зеркало имеет плоскую и вогнутую поверхности. Плоское зеркало используют при естественном освещении для больших увеличений, а вогнутое – при искусственном и естественном освещении для малых увеличений.

Ирис-диафрагма регулирует количество световых лучей, идущих от зеркала, и состоит из тонких серповидно изогнутых пластинок, которые можно сдвигать и раздвигать при помощи рычажка.

Конденсор служит для усиления яркости освещения рассматриваемого объекта путем конденсирования лучей света, отраженных зеркалом, и перемещается с помощью специального винта.

- Объектив (основная оптическая часть микроскопа), состоящий из системы линз, заключенных в металлическую оправу. Увеличение дает передняя, или фронтальная, линза, а остальные только исправляют

недостатки полученного изображения и называются коррекционными.

Объективы малого увеличения (3×, 5×, 8×, 9×) применяют для предварительного осмотра препарата, объективы среднего увеличения (20×, 40×, 60×) – для изучения крупных клеток микроорганизмов (например, грибов). Эти объективы называют сухими, так как между фронтальной линзой и рассматриваемым препаратом находится слой воздуха.

Объективы большого увеличения (85×, 90×) – иммерсионные. При работе с ними препарат должен быть максимально освещен. При этом фронтальная линза объектива погружается в жидкую среду, коэффициент преломления которой близок к коэффициенту преломления стекла (1,53). В результате между стеклом, на котором находится препарат, и линзой устанавливается однородная среда с равным показателем преломления.

В работе с объективом 85× используют воду с показателем преломления  $n = 1,33$ , а при работе с объективом 90× – кедровое масло ( $n = 1,515$ ).

• Окуляры, состоящие из двух линз – глазной (верхней) и собирающей (нижней). Увеличивающая способность окуляров – 7×, 10×, 15×. При этом общее увеличение микроскопа равно произведению увеличения объектива на увеличение окуляра. Например, если увеличение объектива 90×, а окуляра 15×, то общее увеличение – 1350 раз.

#### *Микроскопия в темном поле*

В основе метода лежит эффект Тиндаля (рассеивающийся пучок света при наблюдении сбоку имеет вид голубоватого конуса на темном фоне). Другими словами, при освещении объекта косыми лучами света эти лучи, не попадая в объектив, остаются невидимыми для глаза, поэтому поле зрения выглядит темным. В то же время оптически неоднородные клетки, находящиеся в поле зрения и попадающие в сферу прохождения лучей, отклоняют их в такой степени, что лучи попадают в объектив. Поскольку лучи света идут именно от объектов, наблюдатель видит их в темном поле интенсивно светящимися.

Темное поле зрения можно создать в светооптическом микроскопе, заменив обычный конденсор темнопольным и применив источник сильного света. Однако эффект темного поля может быть достигнут только в случае, если апертура конденсора превышает на 0,2–0,4 единицы апертуру объектива. Для исследования в темном поле рекомендуют конденсор с апертурой около 1,2 и объективы с апертурой 0,6–0,85. Важно обращать внимание на толщину предметных (0,8–1,2 мм) и покровных (0,17 мм) стекол, толщину препарата (в воде) и чистоту используемых стекол. Чем толще препарат и чем больше в нем посторонних частиц, преломляющих световые лучи, тем менее контрастно получаемое изображение, так как каждая частица, отражая лучи, освещает поле зрения.

Метод используется при исследовании живых клеток микроорганизмов. Он особенно ценен для функционально-морфологического изучения крупных объектов, например дрожжей. Цитоплазма дрожжевых организмов (при условии яркого источника света и хорошего иммерсионного объектива) опалесцирует слабо и равномерно. На ее фоне четко различаются черные оптически пустые вакуоли, капли жира в виде сильно блестящих гранул. Протопласт погибающих клеток опалесцирует молочно-белым цветом.

#### *Микроскопия с фазово-контрастным устройством*

Глаз человека различает световые волны по длине (цвет) и амплитуде (интенсивность, контрастность), но не различает их по фазе.

Почти все живые клетки прозрачны, так как световые лучи, проходя через них, не меняют своей амплитуды, хотя и изменяются по фазе. Превратить «фазовый» (неконтрастный) препарат в «амплитудный» (контрастный) можно либо окрашивая объект (для живых клеток этот прием малопригоден), либо снижая апертуру конденсора путем прекрывания диафрагмы (прием также нежелателен, так как снижает разрешающую способность микроскопа).

Метод фазово-контрастной микроскопии разработан для наблюдения за прозрачными объектами. Он основан на преобразовании фазовых изменений, претерпеваемых световой волной при прохождении через объект, в видимые амплитудные с помощью определенного оптического устройства.

Если в объектив обычного микроскопа вмонтировать специальный диск – фазовую пластинку с кольцом (получается путем напыления диска солями редких металлов толщиной в несколько десятых микрометра), а в конденсор – кольцевую диафрагму (непроницаемую для лучей света пластинку с прозрачной щелью в виде кольца) так, чтобы через конденсор и объектив проходило лишь кольцо света, которое затем совмещается с кольцом фазовой пластинки объектива, то фазы проходящего светового луча сдвигаются (обычно на  $\frac{1}{4}$  длины волны), фазовые изменения переходят в амплитудные и препарат становится контрастным.

Для проведения исследований необходимо в дополнение к световому микроскопу иметь фазово-контрастное устройство (наиболее широко распространена модель КФ-4), которое состоит из фазовых объективов (на оправе имеется буква Ф), конденсоров с набором кольцевых диафрагм и вспомогательного микроскопа (оптического устройства, помещаемого в тубус вместо окуляра при установке фазового контраста).

Метод применяют для исследования живых клеток микроорганизмов, контрастность которых достигается оптическим путем без вмешательства в их физиологические процессы.

### *Люминесцентная, или флуоресцентная, микроскопия*

Некоторые биологические объекты способны при освещении коротковолновыми лучами (сине-фиолетовым и ультрафиолетовыми) поглощать их и испускать лучи с более длинной волной. При этом клетки будут светиться желто-зеленым или оранжевым светом. Это собственная, или первичная, люминесценция.

Нелюминесцирующие объекты можно обработать специальными флуоресцирующими красителями – флуорохромами (акридином желтым, акридином оранжевым, аурамином, примулином, тиофлавином, конго красным) и также наблюдать люминесценцию. Это будет наведенная, или вторичная, люминесценция.

Препараты, окрашенные флуорохромами, изучают в средах, не люминесцирующих под действием коротковолновых лучей: в воде, глицерине, вазелиновом масле или физиологическом растворе.

Оптическая схема люминесцентного микроскопа отличается от оптической схемы обычного микроскопа источником света (можно использовать ртутную лампу, а если возможно возбуждение люминесценции объекта сине-фиолетовыми лучами, – то и низковольтные лампы) и наличием на пути лучей двух светофильтров: синего светофильтра перед конденсором, пропускающего сине-фиолетовые лучи видимого спектра, и желтого светофильтра в окуляре микроскопа, убирающего синие лучи, мешающие выявлению люминесценции.

Люминесцентная микроскопия по сравнению с обычной позволяет сочетать цветное изображение и контрастность объектов; изучать морфологию живых и мертвых клеток микроорганизмов в питательных средах и тканях животных и растений; исследовать клеточные микроструктуры, избирательно поглощающие различные флуорохромы, являющиеся при этом специфическими цитохимическими индикаторами; определять функционально-морфологические изменения клеток; использовать флуорохромы при иммунологических реакциях и подсчете бактерий в образцах с невысоким их содержанием.

Наиболее удобен для микробиологических исследований микроскоп люминесцентный МЛ-2.

### *Электронная микроскопия*

По схеме строения электронный микроскоп аналогичен световому, но освещение объекта обеспечивает не луч света, а поток электронов от вольфрамовой нити, нагреваемой электрическим током.

Разрешающая способность современных электронных микроскопов составляет 0,2–0,4 нм, рабочее увеличение в среднем – 100 000 раз.

### *Трансмиссионный электронный микроскоп*

Трансмиссионный (от лат. *transmissio* – передача, переход) микроскоп широко применяют в биологических исследованиях. Каждый электронный микроскоп состоит из электронной пушки (источника электронов); электромагнитных катушек, выполняющих роль конденсорной, объективной и проекционной линз; предметного столика; экрана для изображения и окуляра. Для работы микроскопа необходим вакуумный насос, так как движение электронов возможно только в вакууме. Электроны в трансмиссионном микроскопе движутся по такому же пути, как и лучи света в световом микроскопе.

Изображение объекта можно сфотографировать, если заменить флуоресцирующий экран (металлическую пластину, покрытую тонким слоем сульфида цинка или смеси сульфида цинка с селенидом кадмия) фотопластинкой.

Препараты для электронно-микроскопических исследований помещают на специальные сетки, на которые нанесена тончайшая пленка (подложка). Общая толщина препарата и подложки не должна превышать 0,25 мкм.

При изучении под электронным микроскопом морфологических особенностей клеток микроорганизмов исследуются целые клетки, для изучения ультраструктуры клеток – их срезы. Толщина срезов не должна превышать 0,8–0,9 мкм. Контрастность объекта обеспечивается напылением его тяжелыми металлами (хромом, золотом, палладием) или обработкой различными контрастирующими веществами (фосфорно-вольфрамовой кислотой, уранилацетатом и др.).

### *Сканирующий, или растровый, электронный микроскоп*

Сканирующий микроскоп дает объемное, почти трехмерное изображение исследуемого объекта. В сканирующих микроскопах подвижный тонкий электронный луч очень быстро и последовательно обегает поверхность исследуемого объекта по квадратному растру и передает полученную информацию на электронно-лучевую трубку, покрытую люминофором, светящимся под действием электронов. Глубина фокуса сканирующего микроскопа достигает нескольких миллиметров; пределы полезного увеличения – 10–15 тыс. раз, разрешающая способность меньше, чем у трансмиссионных электронных микроскопов.

Препараты для сканирующего микроскопа подвергают специальной обработке, основная цель которой – обезвоживание объекта без нарушения (сморщивания) поверхности структур. Затем препарат покрывают тонким слоем сплава золота или платины, что делает его поверхность электропроводной и позволяет избежать накопления электрического заряда, который может снизить разрешающую способность микроскопа.

## Работа в лаборатории

1. Изучите оборудование микробиологической лаборатории и правила работы в ней.
2. Изучите устройство и работу микроскопа.

### Задание 2. Техника микроскопирования микроорганизмов. Приготовление мазков

Для исследования морфологии микроорганизмов готовят специальные препараты.

Препараты готовят, как правило, на предметных стеклах толщиной не более 1,2–1,4 мм. Поверхность стекла должна быть тщательно очищена и обезжирена, например, хромовой смесью, промыта водой и прокалена в пламени спиртовки. Для приготовления препаратов живых микроорганизмов используют покровные стекла толщиной до 0,17 мм, которыми накрывают препарат. Чистые стекла хранят в сухом состоянии или в обезжиривающих жидкостях.

Живые микроорганизмы исследуют в лабораториях весьма ограниченно. Из-за малой контрастности живых клеток этот метод пригоден для изучения морфологии только крупных микроорганизмов, например, микроскопических грибов.

Для работы с микроорганизмами используют специальные бактериологические иглы, петли и шпатели (рис. 2).

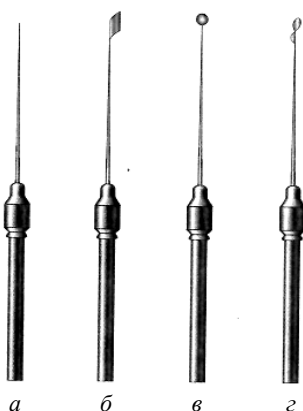


Рис. 2. Инструменты, используемые при работе с микроорганизмами:

- а – бактериологическая игла; б – шпатель; в – петля, сделанная правильно;  
г – петля, сделанная неправильно

Их изготавливают из платиновой проволоки, которую закрепляют в специальных металлических держателях или впаивают в стеклянные палочки. Толщина игл и петель не должна превышать 0,5 мм, толщина шпателя может быть 1,5 мм и более.

При посевах и пересевах культур микроорганизмов из колоний, выросших на плотных средах, применяют иглы или шпатели. Последние используют и для взятия клеток микроорганизмов из колоний, растущих в субстрат. Суспензии микроорганизмов берут петлей.

При приготовлении препаратов микроорганизмов предметные стекла удерживают на весу пинцетом Корнэ или специальными пинцетом-держателями. Сушить препараты целесообразно на верхнем ярусе сушильного металлического столика Коха (рис. 3). Промывать их удобно на приспособленных перекладках или на так называемых препаратодержателях – параллельно расположенных стеклянных палочках, соединенных резиновыми трубками (длина палочек 20–30 см, трубок – 15–20 см). Палочки устанавливают над фарфоровыми чашками или ваннами.

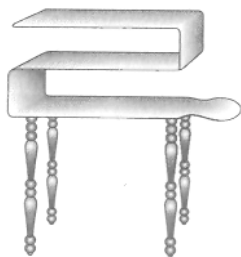


Рис. 3. Столик Коха



### ***Техника взятия культуры для приготовления препарата***

Пробирку с культурой держат в левой руке почти в горизонтальном положении вблизи горелки. Перед взятием культуры правой рукой вынимают ватную пробку из пробирки, зажимая ее между мизинцем и ладонью, а края пробирки обжигают на пламени горелки. Иглу держат в правой руке большим, указательным и средним пальцами. Обожженной в пламени бактериологической иглой из пробирки берут небольшое количество микробной массы.

Если культуру берут из жидкой среды, не следует сильно наклонять пробирку, чтобы не смочить ее края и пробку. Для взятия культуры лучше пользоваться петлей. После взятия культуры края пробирки и пробку обжигают в пламени и закрывают пробирку.

### ***Исследование живых клеток микроорганизмов методами «раздавленной» и «висячей» капли***

В обоих случаях окрашивание объекта проводят «прижизненными» красителями (витальная окраска). Прижизненными красителями могут служить метиленовый синий, нейтральный красный в концентрациях от 0,001 до 0,0001%.

Оба метода применяют для выявления подвижности клеток микроорганизмов, наблюдения за размножением, образованием и прорастанием спор, установления реакции микроорганизмов на химические соединения и физические факторы воздействия, изучения размеров клеток, характера их расположения, определения запасных веществ в клетке.

Препараты микроскопируют, слегка затемняя поле зрения, конденсор немного опускают, поступление света регулируют вогнутым зеркалом. Вначале используют малое увеличение – объектив 8×, после того как обнаруживают край капли, устанавливают объектив 40× или иммерсионный объектив (90×). Более четкие результаты можно получить при микроскопии в темном поле или в фазовом контрасте.

В случае использования метода «раздавленной капли» на чистое предметное стекло наносят каплю водопроводной воды. В нее вносят культуру и смешивают с водой. Накрывают каплю покровным стеклом так, чтобы под ним не образовывались пузырьки воздуха. Стекло палочкой прижимают покровное стекло к предметному и удаляют избыток воды фильтровальной бумагой, поднося ее к краям покровного стекла. При просмотре приготовленного препарата под микроскопом с иммерсионным объективом на покровное стекло наносят каплю кедрового масла.

Метод удобен для исследования подвижности бактериальных клеток, а также просмотра крупных объектов – микроскопических грибов, дрожжей. Его применяют также при изучении запасных веществ клетки.

Для длительных наблюдений за клетками микроорганизмов применяют метод «висячей капли». Для него требуется специальное предметное стекло с лункой посередине. На стерильное покровное стекло наносят иглой негустую суспензию микроорганизмов, выращенных в жидкой питательной среде или подготовленных для данной цели. При выращивании на плотной среде микроорганизмы предварительно разводят в физиологическом растворе (0,5% NaCl). Покровное стекло переворачивают и помещают на стерильное предметное стекло с лункой так, чтобы капля свободно свисала в лунку. Для герметичности края лунки смазывают вазелином.

### ***Фиксированные препараты микроорганизмов***

Фиксированные препараты рассматривают под микроскопом в окрашенном виде. Под фиксацией подразумевается такая обработка живого объекта, которая дает возможность быстро прервать течение жизненных процессов в объекте, сохранив его тонкую структуру. В результате фиксации клетки прочно прикрепляются к стеклу и лучше прокрашиваются. Фиксация необходима в случае работы с патогенными микроорганизмами (в целях безопасности).

*Приготовление мазка.* На чистое обезжиренное предметное стекло наносят каплю водопроводной воды. Для обезжиривания стекол используют смесь этилового спирта и серного эфира в соотношении 1:1. Эти операции проводят вдали от горелок. Прокаленной бактериологической иглой из пробирки с культурой берут небольшое количество микробной массы и вносят в каплю воды. Каплю тщательно размазывают петлей по стеклу на площади около 4 см<sup>2</sup>.

В случае, если суспензия густая, ее сначала разводят водой. Для этого прокаленной петлей берут немного суспензии и переносят в каплю воды на другое предметное стекло. Суспензию размазывают тонким слоем по стеклу, затем мазок сушат на воздухе при комнатной температуре или при слабом нагревании, держа препарат высоко над пламенем горелки. Сильное нагревание препарата при сушке не рекомендуется для избежания коагуляции белков, искажающей структуру и форму клеток. Высушенный препарат фиксируют.

*Фиксацию мазка* проводят над пламенем горелки при исследовании формы клеток или при помощи химических соединений для изучения внутренней структуры клеток. В первом случае препарат 3–4 раза медленно проводят нижней стороной над пламенем горелки. Во втором случае используют хромовые соединения, формалин, осмиевую кислоту, ацетон.

Одним из распространенных приемов фиксации является обработка препарата 96%-ным спиртом или

смесью равных объемов этилового спирта и эфира (жидкость Никифорова). Для этого препараты погружают на 10–30 мин в фиксирующую жидкость.

*Окрашивание препарата.* Для окрашивания микроорганизмов применяют *кислые и основные красители*. Первые вступают в реакцию с веществами основной природы, вторые – кислотной природы. Поскольку в белках есть и основные ( $\text{NH}_2$ ), и кислотные ( $\text{COOH}$ ) радикалы, клеточные структуры хорошо окрашиваются и теми, и другими красителями.

Из основных красителей наиболее часто в микробиологии применяют следующие: красные – нейтральный красный, сафранин, фуксин, гематоксилин; синие – виктория, метиленовый синий; фиолетовые – генциан фиолетовый, кристаллический фиолетовый, метиленовый фиолетовый; зеленые – янус зеленый, метиленовый зеленый, малахитовый зеленый; коричневые – везувин, ризоидин; черные – индулин.

Кислые красители могут быть красные и розовые – кислый фуксин, эритрозин; черные – нигрозин; желтые – конго, пикриновая кислота, флуоресцин.

Основные красители интенсивнее окрашивают объект в более щелочной среде, кислые – в более кислой. Чтобы различить растворы кислых или основных красителей, в них погружают полоски фильтровальной бумаги. Они несут отрицательный электрический заряд. При окрашивании основным раствором его катионы, обуславливающие окрашивающую способность, фиксируются отрицательным зарядом бумаги, и по ней вследствие капиллярности будет распространяться только вода (в виде бесцветной полосы). Если раствор содержит кислый краситель, его анионы будут подниматься по бумаге и окрасят ее.

Красители можно разделить на позитивные и негативные.

Позитивные красители окрашивают непосредственно клетки микроорганизмов и другие объекты. Из красителей, применяемых в микробиологии, большинство относится к позитивным. Они окрашивают клетки при комнатной температуре в течение 30–60 с.

Негативные красители окрашивают пространство, окружающее клетки микроорганизмов. В результате клетки выглядят силуэтами на окрашенном фоне.

Некоторые микроорганизмы (например, спирохеты) и отдельные структуры (внеклеточная слизь), плохо выявляемые с помощью позитивных красителей, хорошо прокрашиваются негативными красителями. Споры без соотвествующей обработки не прокрашиваются, и поэтому при окрашивании клеток бацилл позитивными красителями они имеют вид преломляющих свет включений в вегетативных клетках.

При окрашивании мазка препарат помещают на препаратодержатель. На мазок наносят несколько капель красителя. В зависимости от вида красителя и цели исследования продолжительность окрашивания варьируется от 1 до 5 мин, в отдельных случаях занимая до 30 мин и более. По окончании окрашивания препарат промывают водой, фильтровальной бумагой удаляют воду, подсушивают на воздухе и микроскопируют.

Существуют простые и дифференцированные методы окраски.

При простой окраске используют какой-либо один краситель, например метиленовый синий, фуксин, генциан фиолетовый в щелочных или карболовых растворах. При этом прокрашивается вся клетка.

Окрашивание живых клеток микроорганизмов (витальная окраска) – очень трудоемкий процесс и поэтому используется в микробиологии редко. Микробные клетки фиксируют не только в целях безопасности (если культуры патогенны) или закрепления их на стекле, но и для того, чтобы они могли более интенсивно поглотить краситель. Предполагают, что при фиксировании увеличивается число свободных амино- и карбоксильных групп, в результате повышается сродство клетки к красителю.

При дифференцированной окраске отдельные структуры клетки окрашиваются разными красителями (методы окраски по Граму, окраски спор).

*Окраска по Граму* является дифференциальной и широко используется для определения видовой принадлежности бактерий. В зависимости от способности окрашиваться по методу Грама все бактерии делятся на грамположительные ( $\text{Gr}_+$ ) и грамотрицательные ( $\text{Gr}_-$ ). Грамположительные бактерии удерживают комплекс красителя генцианового фиолетового с йодом при обработке спиртом и поэтому окрашиваются в фиолетовый цвет. Грамотрицательные бактерии не обладают такой способностью и обесцвечиваются спиртом. При последующей обработке фуксином они приобретают красную окраску.

Способность бактерий окрашиваться по Граму связана с молекулярной организацией и химическим составом клеточной стенки бактерий.

Техника окраски по Граму состоит в следующем:

1. На фиксированный мазок кладут сухую фильтровальную бумагу, пропитанную генциановым фиолетовым, нанося на бумагу 2–3 капли воды и окрашивают 2 мин.
2. Снимают бумагу, и, не промывая препарат водой, наносят на мазок 2–3 капли раствора Люголя и выдерживают 1–2 мин.
3. Сливают раствор Люголя и для обесцвечивания наносят на мазок этиловый спирт  $96^\circ$  на 30 с.
4. Препарат промывают водой.
5. Для дополнительной окраски наливают на мазок водный раствор фуксина на 1 мин.
6. Промывают препарат водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют с иммерсионным объективом.

Грамположительные бактерии окрашены в синий (фиолетовый) цвет, а грамотрицательные – в розовый (красный).

## Работа в лаборатории

1. Изучите методику приготовления микробиологических препаратов.
2. Изучите методы окраски микробиологических препаратов.

### Задание 3. Культивирование микроорганизмов. Свойства и классификация питательных сред

Выращивание микроорганизмов на питательных средах называют *культивированием* (от лат. *cullus* – выращивание), а развившиеся в результате микроорганизмы – *культурой*. При развитии в жидкой среде культуры образуют суспензию, осадок или пленку, при развитии на плотной среде – колонии. Культура может быть чистой, т. е. содержать потомство клетки только одного вида и накопительной, т. е. состоять преимущественно из клеток одного вида микроорганизмов.

При специальных способах посева, когда в питательную среду вносится одна клетка, в результате ее размножения образуется совокупность особей, которая называется *клон*. По мере роста клона на поверхности плотной питательной среды образуется скопление микробов, видимое невооруженным глазом, которое называется *колонией*.

Микроорганизмы одного вида, выделенные из определенного источника внешней среды (организма человека, животного, пищевого продукта, пробы воды и др.), называются *штаммом*.

Внесение клеток микроорганизмов или какого-либо исследуемого материала (образца почвы, пробы воды) в стерильную питательную среду для получения чистой или накопительной культуры называют посевом. Перенесение уже выращенных клеток из одной среды в другую (стерильную) называют пересевом, или пассированием (от лат. *passus* – чередование).

Обычно микроорганизмы выращивают при определенной постоянной температуре в термостатах (металлических шкафах) или термостатных комнатах. В тех и других постоянная температура поддерживается с помощью терморегуляторов.

Культивирование при определенной температуре называется *инкубацией*, или *инкубированием* (от лат. *incubatio* – выращивание, высиживание птенцов).

Выращивают микроорганизмы в стеклянной посуде: пробирках, колбах или чашках Петри. Для этого стеклянную посуду, не бывшую в употреблении, очищают от щелочи кипячением в растворе, содержащем  $K_2Cr_2O_7$  (6%) и концентрированную  $H_2SO_4$  (6%).

Культивирование микроорганизмов осуществляется на средах, которые называются *питательными*.

Питательные среды должны соответствовать определенным требованиям:

- содержать питательные вещества в легкоусвояемой форме (азотистые, углеродные, минеральные вещества, витамины);
- должны быть изотоничны по отношению к микробной клетке, обладать буферными свойствами;
- иметь оптимальную вязкость и определенный окислительно-восстановительный потенциал;
- обладать стерильностью.

В ряде случаев в качестве питательной среды используют натуральные продукты (картофель, молоко, мясо и т. д.). Такие среды называются *естественными*. Однако чаще в лабораторной практике используются специально приготовленные по определенным рецептам *искусственные* среды.

Питательные среды различны по составу, консистенции и назначению.

По составу среды делятся следующим образом:

- *простые*, пригодные для культивирования многих видов микроорганизмов (мясопептонный агар (МПА), мясопептонный бульон (МПБ), сусло-агар, неохмеленное пивное сусло);
- *сложные*, которые готовят на основе простых, добавляя к ним питательные вещества, необходимые для более требовательных видов микроорганизмов (сахарный бульон, кровяной агар).

По консистенции среды делятся на жидкие, полужидкие и плотные.

К *жидким* средам относятся мясопептонный бульон, сусло и др. Уплотнение сред достигается добавлением агара (плотного волокнистого материала, получаемого из морских водорослей и образующего в водных растворах гель) и желатина (белкового вещества животного происхождения).

*Плотными* средами являются, например, мясопептонный агар, сусло-агар, мясопептонный желатин.

Жидкой средой для аэробных культур заполняют обычно  $\frac{1}{3}$  пробирки, для анаэробных –  $\frac{2}{3}$ . Если плотная среда в пробирках предназначена для последующего выращивания микроорганизмов, при подготовке к стерилизации ее наливают на  $\frac{1}{3}$ – $\frac{1}{4}$  объема пробирок.

После стерилизации пробирки с еще не застывшей средой раскладывают на ровной поверхности стола в наклонном (под небольшим углом) положении для получения скошенной поверхности агара. Это так называемые косяки – косые или скошенные среды.

Плотная среда, застывшая при вертикальном положении пробирки, называется столбиком. Столбики питательной среды, занимающей  $\frac{1}{3}$ – $\frac{1}{2}$  объема пробирки, используют для посева культуры уколом. Столбики питательной среды, занимающие  $\frac{2}{3}$  объема пробирки, после стерилизации применяют для заливки стерильных чашек Петри, предназначенных для микробиологических посевов.

По назначению среды являются элективными и дифференциально-диагностическими.

*Элективные (накопительные)* среды обеспечивают преимущественное накопление одного вида или группы микроорганизмов и менее пригодны или вовсе непригодны для развития других.

*Дифференциально-диагностические* среды служат для идентификации неизвестных видов микроорганизмов. К ним относятся среды для определения способности микробов к расщеплению белков (мясопептонный желатин), ферментации углеводов (среды Гисса, Эндо), гемолитической способности (кровяной агар) и т. д.

Пробирки со средами и культурами во время работы устанавливают в штативы; пробирки со средами, подготовленными к стерилизации, помещают в проволочные корзины или металлические ведра с отверстиями; пробирки с культурами при инкубации или хранении – в картонные коробки.

При культивировании микроорганизмов в колбах используют только жидкие питательные среды. Для аэробных микроорганизмов среду наливают тонким слоем (например, 30 мл в колбы Эрленмейера объемом 100 мл), для анаэробных микроорганизмов колбу заполняют на  $\frac{2}{3}$  объема.

В чашках Петри микроорганизмы культивируют лишь на плотных средах. Высота этой посуды – около 1,5 см, диаметр – 8–10 см, причем диаметр верхней чашки (она служит крышкой) несколько больше диаметра нижней.

#### Задание 4. Изучение методов стерилизации в микробиологии

Стерилизация является одним из важнейших и необходимых приемов в микробиологической практике и означает в переводе с латинского обеспложивание. В микробиологии стерилизацией называют уничтожение микробов или полное их удаление из обработанной среды. Стерилизуют питательные среды, посуду, инструменты и другие предметы для того, чтобы не допустить развития посторонней микрофлоры в исследуемом материале.

Самым распространенным, удобным и надежным способом стерилизации является применение высокой температуры. Существуют различные способы термической стерилизации.

*Стерилизация сухим паром* проводится в сухожаровом шкафу при температуре 160°C в течение 1 ч или при температуре 165–170°C в течение 30 мин. Применяется для обеспложивания стеклянной посуды (рис. 4).

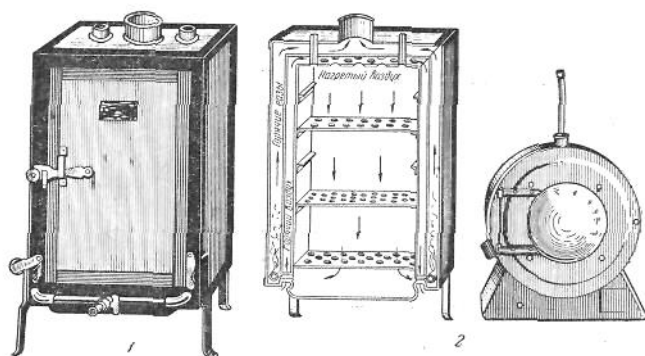


Рис. 4. Сушильные шкафы: 1 – печь Пастера; 2 – стерилизатор с электронагревом

*Стерилизация паром* проводится при температуре 100–130°C. Существует два способа стерилизации паром:

- стерилизация текущим паром (дробная стерилизация);
- стерилизация насыщенным паром под давлением.

*Стерилизация насыщенным паром под давлением* – наиболее быстрый и надежный способ стерилизации, при котором гибнут самые устойчивые споры. С его помощью стерилизуют большинство питательных сред, посуду.

Обработку насыщенным паром проводят в герметически закрывающемся толстостенном котле – автоклаве (рис. 5).

На массивной крышке или сбоку котла находятся кран для выхода пара, манометр и предохранительный клапан. Манометр показывает, на сколько давление пара внутри котла выше нормального. Для предотвращения взрыва при превышении предельного давления срабатывает предохранительный клапан, давая выход пару.

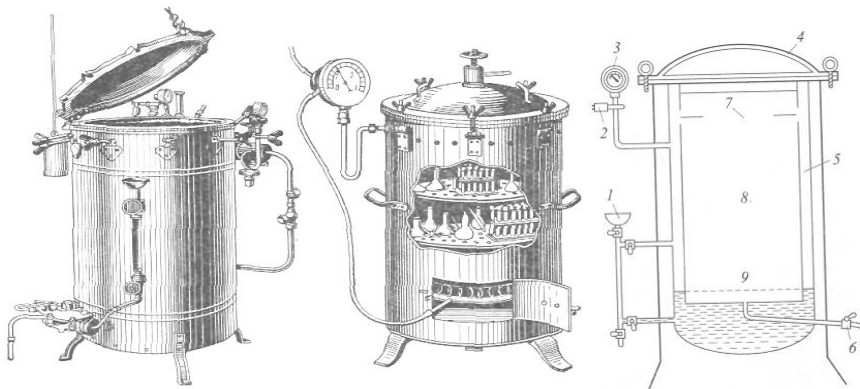


Рис. 5. Схема автоклава: 1 – воронка, через которую автоклав заправляют водой; 2 – предохранительный клапан; 3 – манометр; 4 – крышка автоклава; 5 – водопаровая камера; 6 – кран для выпуска воздуха; 7 – отверстие, через которое пар поступает в стерилизационную камеру; 8 – стерилизационная камера; 9 – подставка для размещения стерилизуемых материалов

Показателю манометра в физических атмосферах соответствует определенная температура.

Надежной стерилизации достигают при нагревании до 120°C и давлении 1 атм в течение 20 мин (табл. 1).

Таблица 1. Режимы стерилизации насыщенным паром под давлением

Давление, атм	Температура, °С
0,5	115
1,0	120
1,5	127
2,0	133

Стерилизацию проводят следующим образом. Наливают воду в автоклав, помещают в него стерилизуемые предметы, закручивают крышку автоклава и начинают подогрев. Кран оставляют открытым до тех пор, пока весь воздух, находящийся в автоклаве, не будет вытеснен парами воды. Когда пар начнет выходить из крана непрерывной струей, кран закрывают, доводят давление пара в автоклаве до 1 атм и поддерживают на этом уровне 20–30 мин. Затем нагрев прекращают, ждут, пока стрелка манометра опустится до 0, осторожно (понемногу) открывают кран и спускают пар. Только потом откручивают крышку автоклава. Если кран открыть раньше, чем упадет давление, то жидкость в стерилизуемых сосудах закипит и вытолкнет из них пробки.

Для контроля за работой автоклавов среди стерилизуемых предметов можно закладывать специальные тесты-ампулы, содержащие химические вещества, которые плавятся при определенной температуре. Так, температура плавления антипирина составляет 113°C.

Автоклав используют и для дробной стерилизации текучим паром. В этом случае крышку не закручивают, чтобы обеспечить свободный выход пару.

*Стерилизация текучим паром* проводится при температуре 100°C в течение 30–60 мин 3 дня подряд по одному сеансу в день для полного уничтожения микрофлоры. Таким способом стерилизуют те питательные среды, которые не выдерживают нагревание выше 100°C (желатин, молоко, среды с углеводами) (рис. 6).

*Тиндализация* – дробная стерилизация при невысокой температуре (56–60°C) по 30–60 минут в течение 5–7 дней подряд. Она применяется для объектов, не переносящих температуру 100°C. Можно проводить ее в водяной бане.

*Пастеризация* проводится при температуре 60–70°C с целью уничтожения бесспорных микроорганизмов в пищевых продуктах (вино, пиво, молоко).

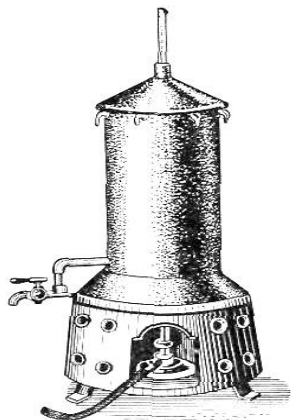


Рис. 6. Кипятильник Коха для стерилизации текучим паром

*Механическая, или холодная, стерилизация* применяется для объектов, которые не выдерживают высокой температуры, химических реактивов из-за денатурации этих объектов (сыворотки).

В этих случаях используют фильтрацию с помощью бактериальных фильтров из мелкопористых веществ (каолина, асбеста, инфузорной земли), которые не пропускают микроорганизмы.

Фильтрация производится под давлением, создаваемым специальным насосом. Прибор должен быть предварительно простерилизован в автоклаве под давлением 1 атм в течение 45 мин (рис. 7).

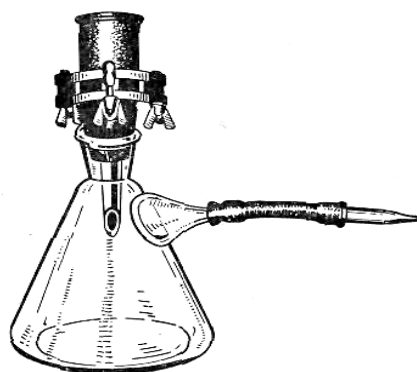


Рис. 7. Фильтровальный аппарат для холодной стерилизации

*Прокаливанием* на огне стерилизуют бактериологические петли, иглы, пинцеты, предметные стекла. *Кипячение* применяется для стерилизации игл, шприцев и других мелких инструментов.

### ***Работа в лаборатории***

Изучите питательные среды для выращивания микроорганизмов и методы стерилизации.

### ***Контрольные вопросы***

1. Назначение микробиологической лаборатории и правила работы в ней.
2. Устройство и принцип работы биологического микроскопа.
3. Основы техники микроскопирования: приготовление препарата-мазка, препаратов «висячая капля» и «раздавленная капля».
4. Каковы методы окраски микроорганизмов и сущность метода окраски по Граму?
5. Что означают понятия «культивирование микроорганизмов», «колония», «штамм»?
6. Требования, предъявляемые к питательным средам.
7. Как классифицируются питательные среды?
8. Что такое стерилизация?
9. В чем заключается сущность термической стерилизации? Каковы ее методы?
10. Особенности холодной стерилизации.

## Работа 2. МОРФОЛОГИЯ СОВЕРШЕННЫХ И НЕСОВЕРШЕННЫХ ГРИБОВ. ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР ПРОТЕЯ, СЕННОЙ И КАРТОФЕЛЬНОЙ ПАЛОЧЕК

**Цель работы:** изучить морфологию грибов и технику их микроскопирования; ознакомиться с принципами выделения накопительных культур микроорганизмов.

### Материальное обеспечение

1. Микроскопы.
2. Чашки Петри с культурами совершенных и несовершенных грибов.
3. Сено, картофель, несвежее мясо.
4. Бактериологические петли.
5. Колбы конические (4–5 шт. на подгруппу).
6. Электроплитки (2 шт. на подгруппу).
7. Препаровальные иглы.
8. Предметные и покровные стекла.
9. Смесь спирта и глицерина (1:1).
10. Стекланные палочки.
11. Биологические пробирки со скошенным МПА (по 1 шт. на студента).
12. Чашки Петри (нестерильные).
13. Шкаф сушильный с температурой 100°C.
14. Мел.

*Грибы* – низшие растительные организмы, лишённые хлорофилла. Грибы состоят из нитей (гифов), которые, разрастаясь, образуют тело гриба и мицелий. Гифы могут быть одноклеточными и многоклеточными.

Мицелий гриба частично или полностью погружен в питательный субстрат. В определенный период развития на поверхности субстрата образуется плодовое тело, которое состоит из плодоносящих гифов и органов спороношения. Плесневые грибы развиваются на питательных средах в виде паутинообразных, пушистых, бархатистых налетов различной окраски (желтой, черной, зеленой, коричневой), по которой можно отличить один гриб от другого.

Грибы различаются также строением мицелия и органов размножения. В зависимости от строения и способов размножения грибы делятся на настоящие и миксомицеты. Настоящие грибы, в свою очередь, подразделяют на следующие классы:

1. Хитридиомицеты (Архимидеи).
2. Оомицеты.
3. Зигомицеты.
4. Аскомицеты.
5. Базидиомицеты.
6. Дейтеромицеты (несовершенные грибы).

### Задание 1. Морфология совершенных грибов

Особенностью совершенных грибов является то, что они способны к половому и бесполому размножению. Они широко распространены в природе и вызывают порчу пищевых продуктов. Это грибы из родов *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phizopus*.

*Род Мукор (Mucor)* – головчатая плесень, развивается на питательных субстратах в виде пушистого белого или серого налета на продуктах растительного происхождения и навозе травоядных животных. Мицелий муковых грибов пронизывает субстрат и частично стелется по его поверхности. Вверх от грибницы отходят особые воздушные гифы – спорангиеносцы, вздувающиеся на концах. Вздутия представляют собой спорангии, в дальнейшем они отделяются от спорангиеносцев перегородкой. В спорангиях бесполом путем образуются многочисленные спорангии-споры – эндоспоры (от греч. *endon* – внутри).

Перегородка, отделяющая спорангий от спорангиеносца, расположена куполообразно, поэтому верхняя часть спорангиеносца оказывается внутри спорангия. Этот участок спорангиеносца называется колонкой и у разных видов муковых грибов имеет различную форму (грушевидную, шаровидную, цилиндрическую).

Для просмотра муковых грибов следует осторожно взять препаровальной иглой небольшое количество мицелия и другой препаровальной иглой снять его на сухое предметное стекло. Препарат сначала рассматривают без покровного стекла при малом увеличении микроскопа. Видны спорангиеносцы и круглые темные шарики на их концах – спорангии. Обычно они покрыты тонкими шипами из кристаллов оксалата кальция. Затем на поверхность препарата наносят каплю воды, накрывают его покровным стеклом. Оболочка спорангия при этом разрушается, и споры выпадают. Препарат рассматривают последовательно при малом и большом увеличении (без иммерсии).

Представители рода *Mucor* (рис. 8 а) могут быть выделены из почвы при посеве пылевидных ее частиц на поверхность сусло-агара в чашках Петри или из свежего конского навоза, помещенного на 3–4 дня под стеклянный колпак на тарелку с влажной фильтровальной бумагой или сырым песком.

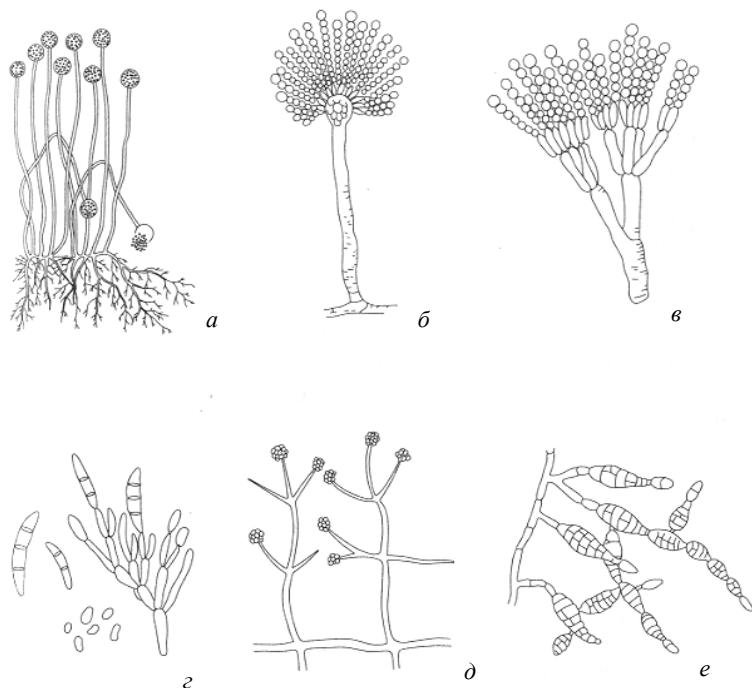


Рис. 8. Грибы микроскопические: а – *Mucor*, б – *Aspergillus*, в – *Penicillium*; г – *Fusarium*, конидиеносец с конидиями; д – *Trichoderma* (конидиеносцы с головками конидий); е – *Alternaria*, конидиеносцы с цепочками конидий

*Аскомицеты, или сумчатые грибы*, – высшие грибы с многоклеточным или членистым мицелием, образующие споры в сумках (асках). Они включают представителей эуаскомицетов (истинных аскомицетов), у которых сумки со спорами формируются в результате полового процесса на поверхности или внутри плодовых тел, образуемых сплетением гифов мицелия (возможно бесполое размножение эндогенно возникающими спорами – конидиями), и гемиаскомицетов, у которых плодовые тела отсутствуют.

К гемиаскомицетам относят большинство дрожжей, рассматриваемых отдельно.

Эуаскомицеты включают два важнейших рода почвенных грибов – *Penicillium* и *Aspergillus*, которые нередко называют также плесневыми грибами. К группе плесневых относят и некоторых представителей зитомицетов и несовершенных грибов.

Пенициллы и аспергиллы имеют хорошо развитый многоклеточный мицелий. Размножаются преимущественно конидиальным спороношением. Наблюдаются в виде налета голубого, зеленого, сизого, реже других цветов на продуктах растительного происхождения (варенье, томатной пасте, лимонах и апельсинах), отсыревших изделиях из кожи, обоях. Распространены в верхних слоях почвы.

Грибы рода *Penicillium* (см. рис. 8 в) называют кистевиками, так как они образуют конидии на концах разветвленных конидиеносцев, напоминающих кисть руки. Иногда отдельный пучок конидиеносцев, выходящих из одной точки и отчленивающих конидии, напоминает рисовальные кисти.

Для рассмотрения строения конидиеносцев *Penicillium glaucum* препаровальной иглой вырезают кусочек мицелия (приблизительно 0,5 мм<sup>2</sup>) на границе между его зеленым и белым участками. Гриб к занятию выращивают в чашке Петри, старые грибы с полностью зеленым мицелием не годятся для просмотра. Осторожно с помощью двух препаровальных игл кусочек мицелия снимают со среды и помещают в каплю воды на предметное стекло. Сверху на мицелий кладут покровное стекло. Поскольку мицелиальная пленка гриба довольно толстая, может получиться так, что под покровным стеклом вода не будет целиком окружать исследуемый мицелий. В этом случае надо из капельницы добавлять воду под покровное стекло до тех пор, пока кусочек мицелия не будет со всех сторон окружен водой. Затем слегка надавливают на покровное стекло в центре стеклянной палочкой (или препаровальной иглой). Избыток воды можно удалить фильтровальной бумагой.

Препарат сначала просматривают при малом увеличении, уделяя основное внимание его краям, так как на них обычно хорошо видны кисти конидиеносцев. Когда подходящий участок найден, переходят с объектива 8× на объектив 40× и детально рассматривают кисточки. Во время просмотра при малом увеличении конденсор опускают, при переводе на объектив 40× снова регулируют освещенность поднятием конденсора.

*Aspergillus*, или леечная плесень (см. рис. 8 б), имеет обычно одноклеточные конидиеносцы шаровидно,



булавовидно или грушевидно вздутые. На них располагаются параллельно друг другу короткие кеглеобразные стеригмы, каждая из которых отшнуровывает радиально расположенные цепочки конидий. Некоторые виды аспергиллов имеют два ряда стеригм. Вся головка конидиеносца с радиально расходящимися цепочками конидий напоминает наконечник лейки со струйками воды.

Для ознакомления со строением конидиеносцев аспергилла на примере *Aspergillus niger* препаративной иглой берут небольшое количество мицелия на границе между черным и коричнево-бурым участками колонии и вносят в каплю воды на предметном стекле. Далее поступают так же, как и при просмотре пеницилла. В начальной стадии спорообразования *Aspergillus* похож на *Mucor* (бесцветные головки), затем с возрастом головки покрываются стеригмами, на которых развиваются споры. В результате получаются так называемые кудрявые головки. От мукора аспергилл всегда можно отличить наличием таких головок. У мукора головки гладкие – «лысые», так как споры его эндогенного происхождения (внутренние), а у аспергилла и пеницилла – экзогенные споры (внешние).

Род *Ризопус (Rhizopus)* – возбудители болезни ягод, корнеплодов и растительных продуктов. Мицелий стелется по субстрату в виде длинных гифов (столонов), окрашен в темно-бурый цвет. Органы размножения – спорангии и спорангиеносцы, неветвящиеся, растущие пучками с корневидными отростками (ризондами).

## Задание 2. Морфология несовершенных грибов

В этот класс входят многоклеточные грибы, которые размножаются неполовым путем – оидиями и конидиями, поэтому они называются *несовершенными*, или *дейтеромицеты*.

Несовершенные грибы имеют многоклеточный мицелий, но у них нет полового процесса и совершенной стадии спороношения. Они размножаются бесполом путем при помощи конидий или вегетативно участками гифов. В природе широко распространены представители родов *Fusarium*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Oidium*, *Botrytis*, которых формально относят к дейтеромицетам. Встречаются они на растительных остатках, плодах, семенах и в почве.

Среди грибов рода *Fusarium* (см. рис. 8 г) есть сапротрофы, живущие в почве и на растительных остатках, и паразиты, вызывающие заболевания многих видов растений (увядание, гнили корней, стеблей, плодов, полегание семян древесных и кустарниковых пород, болезни семян, различные пигментации органов растений).

Колонии отдельных видов фузариума на питательных средах (на сусло-агаре) разнообразны по структуре: они могут быть рыхлыми, ватообразными, пушистыми, паутинистыми или плотными пленчатыми. Колонии бывают белые или различных тонов розового или желтого цветов. Нередко питательная среда также окрашивается в разные цвета и оттенки от розового до коричневого.

Фузариумы характеризуются большим разнообразием ферментов, благодаря которым могут использовать в качестве источников питания различные вещества, некоторые виды даже способны усваивать клетчатку.

Приготовив в капле воды препарат обычным способом и рассматривая его под микроскопом, можно увидеть более или менее разветвленные конидиеносцы и очень характерные для фузариума конидии, так называемые макроконидии. Они заострены на концах, продолговатые, согнутые, нередко серповидные, с несколькими перегородками (напоминают бананы). У многих видов фузариума образуются также овальные мелкие бесцветные, чаще одноклеточные, микроконидии.

Грибы рода *Trichoderma* нередко можно обнаружить на коре, древесине, засохших листьях и стеблях, а также на семенах различных трав, кустарников и деревьев; их легко выделить из почвы на подкисленном сусло-агаре. Через 2–3 дня инкубации при температуре 23–25°C на поверхности среды появляется сначала белый, затем с оттенками зеленовато-желтого цвета рыхлоклочковатый войлочный налет, образованный мицелием и скоплением конидиеносцев. С возрастом он становится темно-зеленым. При большом увеличении микроскопа видны прямостоячие, многократно супротивно разветвленные конидиеносцы, приподнимающиеся над мицелием. На вершине конидиеносцев расположены шаровидные головки, каждая из которых состоит из 10–20 одноклеточных бесцветных конидий. Представители этого рода энергично разрушают белковые соединения и разнообразные углеводы. Обладая антибиотическими свойствами в отношении других грибов, в том числе паразитических, триходерма выполняет оздоравливающую функцию в почве.

Разные виды рода *Alternaria* можно выделить с листьев пораженных этим грибом растений картофеля или томата, с семян капусты и других растений, из почвы. Они характеризуются своеобразным (обратнобулавовидным) строением многоклеточных грушевидных конидий, соединенных цепочками. У каждой из них имеется 3–9 поперечных и одна или несколько продольных перегородок. Конидиеносцы, являясь боковыми ответвлениями мицелия, имеют вид простых или слабозветвленных одноклеточных, иногда многоклеточных веточек. Колонии на сусло-агаре сначала светлые, пушистые, затем зеленовато-серые или оливково-черные, бархатистые или ворсистые, нередко с ясно выраженной концентрической зональностью; иногда колонии с самого начала сажисточерные, уплотненные, во многих случаях темный пиг-

мент диффундирует в среду.

Род *Oidium* – молочная плесень – возбудители порчи при хранении растительных и животных продуктов, в частности, кисломолочных продуктов и квашеных овощей. Образует на поверхности субстрата бархатистый белый налет малоразветвленного мноклеточного мицелия. Органы размножения – оидии, образующиеся на концах гифов при их расчленении.

Род *Botrytis* вызывает гниль плодов, ягод, овощей, образует пушистый серый налет. Имеет одноклеточный древовидно разветвленный конидиеносец, несущий на концах ветвей пучки одноклеточных овальных сероватых конидий.

### Задание 3. Изучение морфологии дрожжей

По современным представлениям, дрожжи – это сборная группа одноклеточных микроскопических организмов, относящихся к разным классам грибов, преимущественно – к классу аскомицетов.

Диаметр клеток дрожжей колеблется от 8 до 15 мкм. Форма их разнообразна: эллипсоидная, грушевидная, округлая, цилиндрическая (рис. 9). Клетки имеют достаточно сложную структуру: четко дифференцированные оболочки, ядро и другие клеточные структуры, запасные питательные вещества, вакуоли.

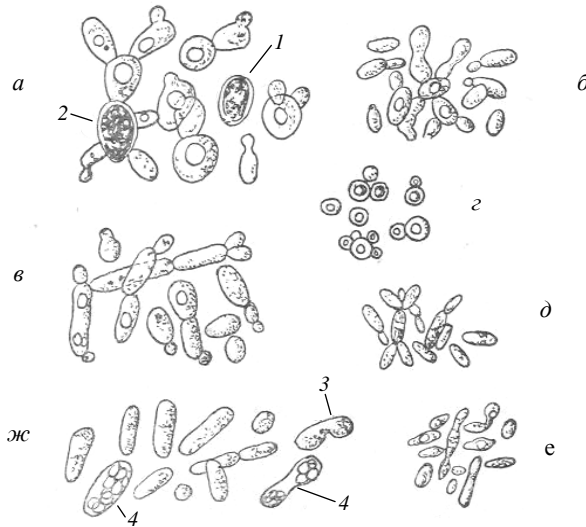


Рис. 9. **Формы клеток дрожжей:** а – яйцевидные (1, 2 – покоящиеся клетки); б – эллипсоидальные; в – палочковидные; г – шаровидные; д – вытянутые; е – лимонообразные; ж – делящиеся дрожжи (3 – коопуляция клеток, 4 – клетки со спорами)

Клетки размножаются вегетативным и половым путем. Вегетативные способы размножения – почкование и деление; половой способ размножения связан с образованием спор. К почкующимся дрожжам (рис. 10 а) относятся представители «культурных» дрожжей рода *Saccharomyces* (сахаромицеты), к делящимся – виды рода *Schizosaccharomyces* (шизосахаромицеты). При половом процессе слияние вегетативных клеток ведет к образованию сумок со спорами. Сначала могут сформироваться споры, которые в последующем копулируют друг с другом. В каждой сумке образуется от 2 до 8, иногда 12 спор. Среди дрожжей есть аспорогенные, ложные дрожжи, не способные к половому процессу и спорообразованию. Клетки имеют достаточно сложную структуру: четко дифференцированные оболочки, ядро и другие клеточные структуры, запасные питательные вещества, вакуоли. Они относятся к классу несовершенных грибов.

С делящимися дрожжами (рис. 10 б) можно познакомиться на примере *Schizosaccharomyces pombe* (*schizo* – рваться, делиться, *saccharomyces* – сахарный гриб, *pombe* – название африканского напитка, из которого этот организм выделен). Дрожжам размножение делением несвойственно, поэтому данный род дрожжей является отклонением от нормы. Шизосахаромицеты размножаются и половым путем, связанным со спорообразованием, что характерно для сумчатых грибов. *Schizosaccharomyces pombe* рассматривают на фиксированных, окрашенных фуксином препаратах. Это крупные клетки цилиндрической формы с округлыми концами. Размножение делением свойственно также дрожжам рода *Endomyces*.

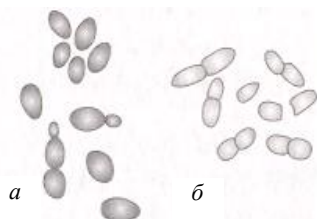


Рис. 10. **Дрожжи:** а – почкующиеся; б – делящиеся

Из почкующихся дрожжей наиболее «домашнены» дрожжи пекарские *Saccharomyces cerevisiae*.

Форма их разнообразна, размножаются почкованием (вегетативный способ размножения) и аскоспорами. При почковании на материнской клетке возникает маленькая выпуклость – почка – дочерняя клетка, в которую переходит одно ядро (рис. 11). Клетка увеличивается в размерах и отделяется. Если условия для такого размножения благоприятны (достаточное количество сахара, соответствующая температура, аэрация), процесс идет очень быстро. У некоторых представителей рода клетки после почкования не успевают разъединиться и возникает псевдомицелий (ложный мицелий).

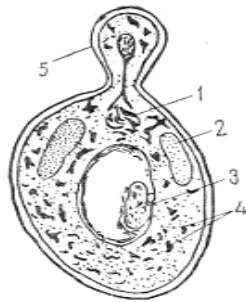


Рис. 11. Строение почкующейся дрожжевой клетки: 1 – делящееся ядро; 2 – гликоген; 3 – вакуоли; 4 – хондриосомы; 5 – почка

В пекарских дрожжах обычно присутствуют две расы: одна представлена округло-эллипсоидными клетками, быстро разъединяющимися при почковании; другая – удлинено-цилиндрическими, образующими при почковании ветвистые кусты (псевдомицелий). На многих клетках видны почки. В мелкозернистом содержимом живых дрожжей хорошо заметны крупные прозрачные вакуоли, занимающие иногда центральное положение.

С представителями аспорогенных дрожжей, размножающихся только почкованием и не образующих спор, можно познакомиться на примере *Candida kefiri*. Их клетки мелкие, диаметром около 5 мкм.

Размножение у дрожжеподобных организмов может происходить также в результате распада гифов на отдельные клетки – оидии, или артроспоры, как у *Geotrichum candidum* (*Oidium laclis*).

Для лабораторных занятий могут быть использованы пекарские дрожжи. Небольшой кусочек дрожжевой массы за несколько часов до занятий помещают в теплую подсахаренную воду и ставят в теплое место. Образуется беловатая мутная жидкость. Для изучения морфологии клеток дрожжей используют препараты живых клеток «раздавленная капля» и «висячая капля».

Для приготовления препарата «раздавленная капля» на предметное стекло наносят бактериальной петлей каплю суспензии дрожжей и осторожно накрывают ее покровным стеклом. Излишек выступившей жидкости удаляют фильтровальной бумагой. Микроскопируют препарат объективами 8×, 20×, 40×.

Для приготовления препарата «висячая капля» небольшую каплю суспензии наносят на покровное стекло с луночкой так, чтобы капля свободно помещалась в центре углубления. Края луночки предварительно смазывают вазелином, препарат переворачивают и микроскопируют. Этот метод используют для изучения подвижности микроорганизмов.

Для обнаружения *гликогена* на предметное стекло наносят каплю раствора йода и размешивают в ней петлей каплю суспензии дрожжей. Препарат покрывают покровным стеклом, удаляют излишек жидкости и через 2–3 мин микроскопируют. Наличие в цитоплазме бурых зернышек или крапинок указывает на присутствие гликогена и свидетельствует об упитанности дрожжей.

Для определения *живых и мертвых клеток* на предметное стекло помещают каплю фуксина или метиленового синего. В каплю петлей вносят суспензию дрожжей, размешивают, накрывают покровным стеклом и микроскопируют суховоздушными объективами. Мертвые клетки окрашиваются сразу; живые клетки пропускают краску постепенно и поэтому остаются определенное время бесцветными.

### Работа в лаборатории

1. Изучите характер роста грибов в чашках Петри визуально и с применением объектива 8×. Обратите внимание на внешний вид, цвет и строение плесени.
2. Изучите строение грибов в препарате «раздавленная капля».
3. Зарисуйте в тетрадь строение каждого гриба, опишите внешний вид.

### Задание 4. Выделение накопительных культур

Для выявления микроорганизмов, находящихся на изучаемом объекте, определения их систематического положения и изучения их свойств, необходимо, прежде всего, вырастить их чистые культуры, а затем идентифицировать. Выделению чистой культуры предшествует получение накопительной культуры.

*Накопительная культура* – культура микроорганизмов, в которой преобладает один из видов желаемой микрофлоры, а другие, сопутствующие, преобладают в незначительном количестве.

Для получения накопительных культур используют элективные среды и создают специальные условия для преимущественного развития выделяемого микроорганизма.

### ***Выделение накопительной культуры протей из мяса***

Протей *Proteus vulgaris* широко встречается в природе, чаще всего в гниющих белковых продуктах, накопление его может быть причиной отравления, спор не образует. Протей очень подвижен, и это свойство используется для его накопления. С этой целью в конденсационную воду, собирающуюся на дне пробирки свежеприготовленного косячка МПА, опускают петлей маленький кусочек загнившего мяса так, чтобы не коснуться поверхности агара. Засеянный агар помещают в вертикальном положении в термостат при температуре 27–30°C. Через 1–2 дня на поверхности косячка образуется характерный налет в виде серо-голубоватой прозрачной пленки.

### ***Выделение накопительной культуры сенной палочки***

Сенная палочка *Bacillus subtilis* – распространенный возбудитель гниения, расщепляет белки, углеводы, тем самым вызывая порчу продуктов животного и растительного происхождения. Естественное место обитания – сено. Получение накопительной культуры сенной палочки из сена основано на высокой термоустойчивости ее спор: при кипячении споры выдерживают нагревание до температуры 100°C в течение 20 мин, в то время как сопутствующие бактерии погибают.

Щепотку измельченного сена поместите в коническую колбу, залейте 50 мл воды, закройте колбу ватной пробкой и кипятите в течение 10 мин. Охлажденную колбу поместите в термостат при температуре 25°C на 2–3 суток.

### ***Выделение накопительной культуры картофельной палочки***

Картофельная палочка *Bacillus mesentericus* широко распространена в природе, всегда находится в почве, а поэтому постоянно встречается на картофеле. Образует очень устойчивые центрально расположенные споры, относится к аэробам.

Накопительную культуру картофельной палочки получают на картофеле, для чего из очищенного картофеля вырезают прямоугольный кусочек. Для нейтрализации сока картофеля натирают всю поверхность кусочком мела и помещают в чашку Петри. Чашку прогревают при температуре 100°C в течение 20 мин. После охлаждения ее ставят в термостат на 2–3 суток при температуре 25–30°C. На картофеле образуется плотная морщинистая пленка светло-коричневого цвета.

### ***Работа в лаборатории***

Приготовьте накопительные культуры протей, сенной и картофельной палочек.

### ***Контрольные вопросы***

1. Каково строение тела плесневых грибов?
2. Особенности строения клетки грибов и дрожжевой клетки.
3. Способы размножения и органы размножения грибов.
4. Что положено в основу систематики грибов?
5. Отличительные особенности совершенных грибов.
6. Отличительные особенности несовершенных грибов.
7. Что называется накопительной культурой?
8. Что положено в основу получения накопительной культуры протей, сенной и картофельной палочек?

### **Работа 3. МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ. ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР. ПОЛУЧЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ**

**Цель работы:** изучить культурально-морфологические свойства накопительных культур протей, сенной и картофельной палочек; выделить чистые культуры из накопительных.

### ***Материальное обеспечение***

1. Микроскопы.
2. Предметные стекла.
3. Бактериологические петли.

4. Спиртовки, спички.
5. Наборы красок для окрашивания по Граму.
6. Пробирки со скошенным агаром.

**Задание 1. Изучение культурально-морфологических свойств накопительных культур протей, сенной и картофельной палочек**

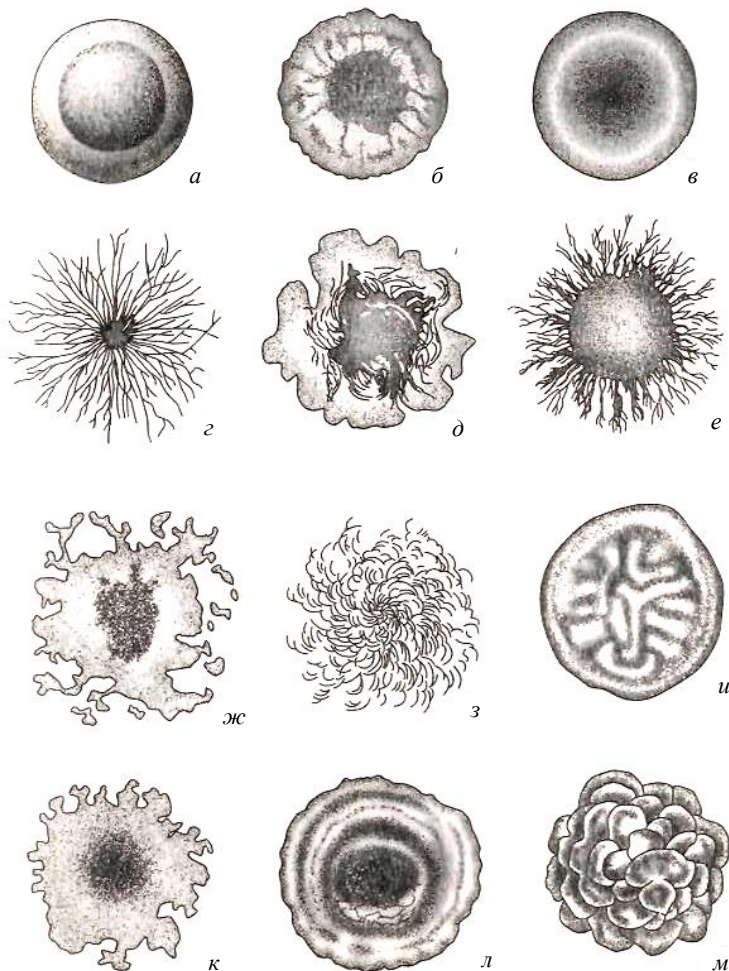
1. Для полученных на предыдущем занятии накопительных культур отметьте наличие и характер налета на косом агаре с культурами протей (голубоватый цвет), наличие и характер пленки на поверхности картофеля (плотная, морщинистая, светло-коричневого цвета), сенного отвара (крупная, морщинистая).

Для каждого вида микроорганизмов отметьте их культуральные свойства, которые устанавливают по особенностям роста колоний на питательных средах (рисунки 12 и 13):

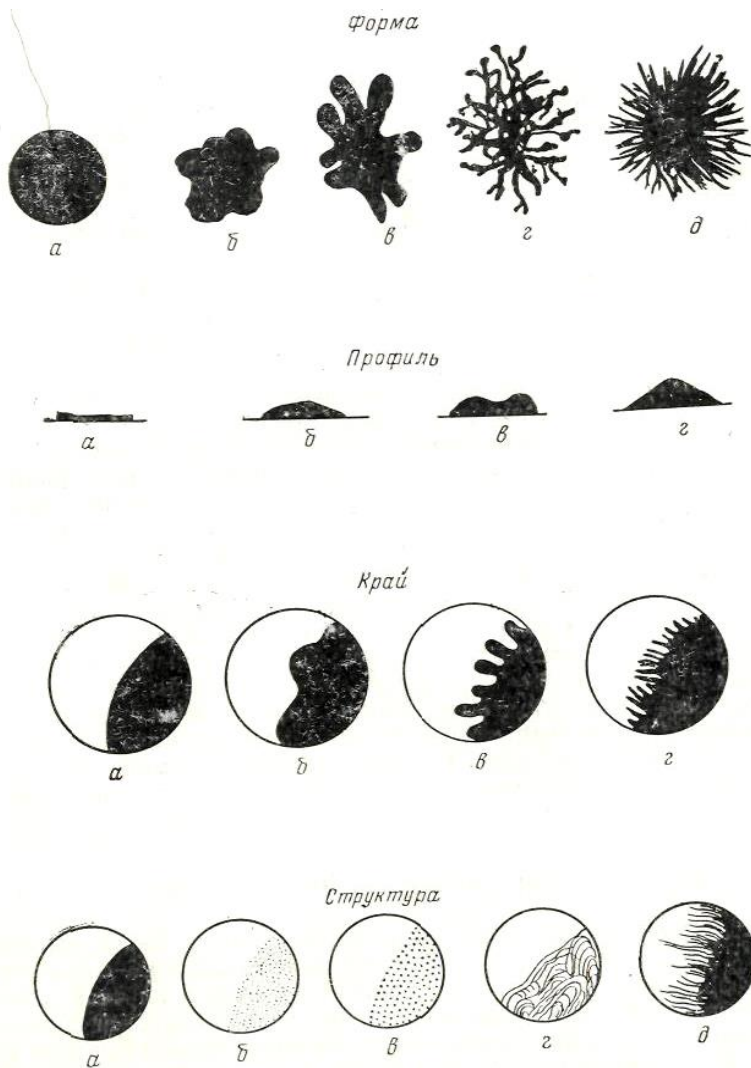
- а) форму (округлая, амёбовидная, неправильная);
- б) размер (точечная, мелкая, крупная);
- в) край (волнистый, зубчатый);
- г) поверхность (гладкая, шероховатая, бугристая);
- д) цвет и оттенок (белая, голубая, желтая, флуоресцирующая и др.).

2. Для изучения морфологических свойств приготовьте фиксированные препараты культур, окрасьте их по Граму и микроскопируйте. Отметьте следующие морфологические признаки каждого микроорганизма:

- а) форму бактерии (кокки, палочки, извитые);
- б) тип роста (отдельные клетки, цепочки, пакеты);
- в) размер клеток (мелкие, крупные, короткие);
- г) спорообразование (наличие спор и их расположение);
- д) окраску по Граму (отрицательная, положительная).



**Рис. 12. Форма колоний микроорганизмов:** а – круглая; б – круглая с фестончатым краем; в – круглая с валиком по краю; г, д – ризоидные; е – круглая с ризоидным краем; ж – амёбовидная; з – нитевидная; и – складчатая; к – неправильная; л – концентрическая; м – сложная



**Рис. 13. Характеристика колоний:** форма колоний: а – округлая, б – неправильной формы, в – амебовидная, г – ризоидная, д – мицелиальная; профиль колоний: а – плоский, б – выпуклый, в – кратерообразный, г – конусовидный; край колоний: а – ровный, б – волнистый, в – лопастной, г – бахромчатый; структура колоний: а – однородная, б – мелкозернистая, в – крупнозернистая, г – струйчатая, д – волокнистая

### **Работа в лаборатории**

Изучите культурально-морфологические свойства полученных накопительных культур протей, сенной и картофельной палочек.

### **Задание 2. Выделение чистых культур**

#### **Выделение чистой культуры из отдельной колонии**

Основным методом выделения чистых культур микроорганизмов до настоящего времени является метод, предложенный Кохом.

Принцип метода заключается в получении чистой культуры из отдельной колонии, которую считают результатом развития одной клетки.

При выделении чистых культур аэробных микроорганизмов высев из накопительной культуры проводят, как правило, на поверхность плотной среды. Порядок работы при этом следующий. Расплавленную на кипящей водяной бане стерильную питательную среду, содержащую агар или желатин, разливают в стерильные чашки Петри. Для этого сосуд со средой берут в правую руку, вынимают из него пробку, зажимая ее мизинцем и безымянным пальцем левой руки, обжигают горло сосуда в пламени горелки и, приоткрыв большим и указательным пальцами левой руки крышку чашки Петри, быстро переливают в чашку расплавленную среду в таком количестве (около 20 мл), чтобы дно чашки было полностью покрыто. Крышку тотчас закрывают и чашку оставляют на горизонтальной поверхности до тех пор, пока не застынет среда. Высев на поверхность агаровых (желатиновых) пластинок проводят из накопительной культуры

или чаще из ее разведения в стерильной водопроводной воде. Разведение делают с таким расчетом, чтобы получить на поверхности среды изолированные колонии. Для посева приоткрывают крышку чашки Петри и на поверхность плотной среды наносят каплю или «петлю» накопительной культуры или разведения. Нанесенную каплю осторожно распределяют *стеклянным стерильным шпателем* (шпателем Дригальского) (рис. 14 а), сначала по одной половине поверхности плотной среды в чашке Петри, затем по второй половине, после чего этим же шпателем протирают поверхность плотной среды последовательно во второй, третьей и четвертой чашках.

Обычно в первых двух чашках после инкубации наблюдают «сплошной» рост микроорганизмов, тогда как в последующих образуются изолированные друг от друга колонии.

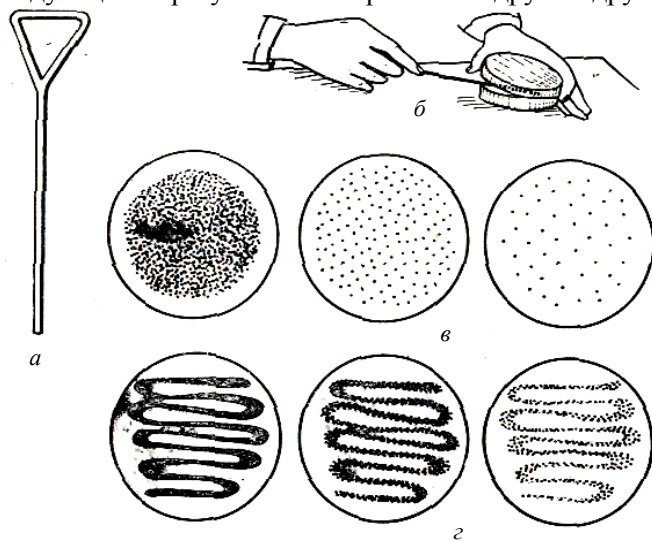


Рис. 14. Рассев культуры микроорганизмов на поверхность плотной среды: а – шпатель Дригальского; б – рассев; в – рост микроорганизмов после посева шпателем; г – рост микроорганизмов после посева петлей

Накопительную культуру на поверхность плотной среды можно рассевать и *штриховым способом* (см. рис. 14 г).

Для этого накопительную культуру обычно разводят в стерильной водопроводной воде в 10–100 раз в зависимости от плотности исходной суспензии. Берут петлю одного из разведений накопительной культуры и проводят зигзагообразную линию или ряд параллельных штрихов через всю поверхность плотной питательной среды в чашке Петри.

Если предварительного разведения накопительной культуры не производили, то следует, не стерилизуя петли, провести последовательно по поверхности плотной среды в двух–трех чашках Петри. После проведения посева чашки помещают в термостат крышками вниз, чтобы конденсационная вода, образовавшаяся на крышке чашки Петри при застывании агара, не помешала получить изолированные колонии. Чашки выдерживают в термостате в течение 1–7 суток, так как скорость роста различных микроорганизмов неодинакова. Чашки необходимо просматривать ежедневно. Выросшие изолированные колонии отсеивают петлей в пробирки на поверхность скошенной плотной среды или в жидкую среду.

#### Определение чистоты выделенной культуры

Чистота культуры выделенного микроорганизма должна быть обязательно проверена. Это осуществляется одновременно несколькими способами – визуальным, микроскопическим контролем и высевом на ряд питательных сред.

Визуальный контроль проводят, когда выделенная культура микроорганизмов высеяна на поверхность скошенного агара. Если культура чистая, то характер ее роста на скошенном агаре однороден по всему штриху. Если штрих неоднороден, культура считается загрязненной.

Проверка чистоты выделенной культуры обязательно включает микроскопический контроль. Для этого следует приготовить препарат фиксированных окрашенных клеток и исследовать его с иммерсионной системой или препарат живых клеток и просмотреть его, используя фазово-контрастное устройство. Чистая культура, как правило, морфологически однородна, допустимо лишь незначительное варьирование размеров клеток. Однако необходимо помнить, что клетки некоторых микроорганизмов, например, микобактерий очень полиморфны, поэтому определение чистоты таких культур при микроскопировании затруднительно.

Чистоту полученной культуры микроорганизмов помимо визуального и микроскопического контроля проверяют посевом ее на ряд питательных сред. Прежде всего, выделенную культуру микроорганизмов высеивают на плотную среду, благоприятную для ее развития. Посев проводят с таким расчетом, чтобы получить изолированные колонии, однородность которых свидетельствует о чистоте выделенной культуры

микроорганизмов. Обязателен посев на мясопептонный агар – среду, благоприятную для развития многих гетеротрофных организмов. Свидетельством чистоты выделенной культуры является также однородность выросших колоний или, напротив, отсутствие роста, если данные микроорганизмы на мясопептонном агаре не развиваются. Следует иметь в виду, что заключение о чистоте некоторых культур микроорганизмов нельзя сделать только по результатам посева на вышеуказанные среды. Особенно это касается автотрофных микроорганизмов, а также представителей гетеротрофных организмов, склонных заселяться в симбиозе с одним или несколькими спутниками. Чистоту таких культур микроорганизмов проверяют посевом еще на ряд сред, таких как сусло, мясопептонный бульон, картофельный агар и др. Набор сред и их состав определяется особенностями обмена веществ выделяемых микроорганизмов и их возможных спутников.

### **Определение числа живых клеток методом посева на питательные среды**

*Определение количества клеток методом посева на плотные среды (чашечный метод).* Сущность метода заключается в посеве определенного объема исследуемой суспензии микроорганизмов на плотную среду в чашки Петри и последующем подсчете выросших колоний. При этом исходят из того, что каждая колония является результатом размножения одной клетки. Чашечный метод особенно широко используется для определения количества микроорганизмов в почве и других естественных субстратах. Однако следует учитывать, что для микроорганизмов, образующих цепочки или другие скопления клеток, результаты по определению их числа будут всегда несколько занижены.

Определение количества клеток по этому методу включает три этапа: приготовление разведений, посев на плотную среду в чашки Петри, подсчет выросших колоний.

*Приготовление разведений.* Чтобы получить изолированные колонии, культуру или материал, содержащий микроорганизмы, как правило, разводят. Обычно разведения проводят в стерильной водопроводной воде, пользуясь постоянным коэффициентом разведения, чаще всего равным 10. Таким образом, получают серию разведений, в которых концентрации клеток образуют геометрическую прогрессию. В ходе одного опыта целесообразно использовать один и тот же коэффициент разведения, так как в этом случае при большом числе подсчетов уменьшается вероятность ошибки. Для приготовления разведений стерильную водопроводную воду разливают по 9 мл в стерильные сухие пробирки. Затем 1 мл исходной суспензии, взятой стерильной пипеткой, переносят в пробирку с 9 мл стерильной воды – это первое разведение (1:10). Полученную в первом разведении суспензию с помощью новой стерильной пипетки тщательно перемешивают, вбирая в пипетку и выпуская из нее полученную взвесь. Эту процедуру выполняют 3–5 раз, что обеспечивает перемешивание суспензии и уменьшает адсорбцию клеток на стенках пипетки. Затем этой же пипеткой берут 1 мл полученного разведения и переносят его во вторую пробирку – это второе разведение (1:100). Таким же образом готовят и последующие разведения. Если используется другой коэффициент разведения, например, 3, тогда первое разведение будет 1:3, второе – 1:9, третье – 1:27 и т. д. Степень разведения определяется плотностью исходной суспензии микроорганизмов и соответственно число разведений тем больше, чем больше плотность исходной суспензии. Для приготовления каждого разведения следует обязательно использовать отдельную пипетку. Пренебрежение этой предосторожностью может привести к получению ошибочного результата, иногда в 100 и более раз превышающего истинный. Ошибка связана с адсорбцией микроорганизмов на стенках пипетки, в результате чего не все клетки удаляются из пипетки при каждом разведении. Часть клеток, оставшаяся на стенках пипетки, может затем попасть в одно из последующих разведений, что и явится причиной получения завышенного результата.

*Посев в чашки.* Высевать суспензию можно поверхностным или глубинным способом.

Перед посевом суспензии поверхностным способом (рис. 15) в стерильные чашки Петри разливают расплавленную плотную, чаще всего агаризованную, питательную среду. Среду обычно разливают из большой колбы последовательно в ряд чашек Петри по 15–20 мл в каждую, и чашки оставляют на горизонтальной поверхности, пока агаризованная среда не застынет.

Поверхность агаризованных сред рекомендуется подсушивать, чтобы образующиеся колонии не расплывались по поверхности агара. Для этого чашки с застывшей средой помещают открытыми в сушильный шкаф, нагретый до температуры 70–80°C. Шкаф предварительно необходимо простерилизовать. Среду подсушивают до появления на ее поверхности муаровой пленки. При этом с крышек чашки Петри удаляется конденсационная вода. В некоторых случаях агаризованную среду подсушивают, помещая чашки в термостат на 2–3 суток крышками вниз. Когда среда готова, на ее поверхность стерильной пипеткой наносят строго определенный объем (0,05–0,2 мл) соответствующего разведения.

Этот объем распределяют стерильным стеклянным шпателем по поверхности агаризованной среды в первой чашке Петри. Затем тем же шпателем проводят по поверхности плотной среды во второй и третьей чашках. Посевы на плотную среду производят обычно из трех последних разведений. Из каждого разведения делают 2–4 параллельных посева. Посевы из разведений можно делать одной пипеткой, но начинать следует обязательно с большего разведения. Для каждого разведения используют новый стерильный шпатель. Засеянные чашки Петри помещают в термостат крышками вниз.



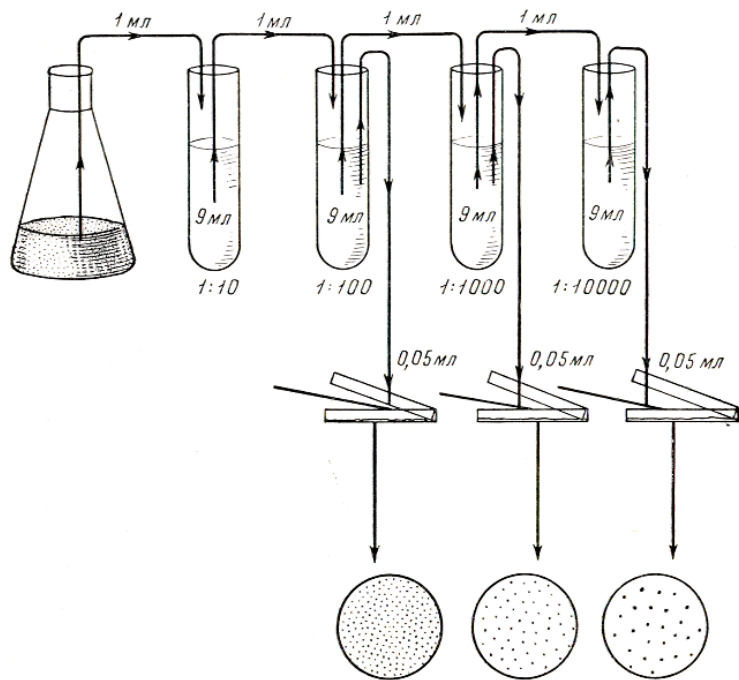


Рис. 15. Схема приготовления разведений суспензии микроорганизмов и проведения посева поверхностным способом

При глубинном способе посева (рис. 16) точно измеренный объем разведенной суспензии вносят в расплавленную и остуженную до 48–50°C агаризованную питательную среду, тщательно перемешивают и затем немедленно выливают в чашку Петри. Среде дают застыть. В случае глубинного посева обычно пользуются средой, разлитой в пробирки. При больших масштабах работы агаризованную среду по пробиркам не разливают, а поступают следующим образом: 1 мл из соответствующего разведения переносят стерильной пипеткой в стерильную чашку Петри.

Таким же образом засевают еще 2–4 чашки Петри из этого же разведения. Затем, осторожно приоткрыв под углом крышку чашки Петри, заливают дно чашки 15–20 мл расплавленной и остуженной до температуры 48–50°C агаризованной среды. Крышку чашки Петри закрывают и тщательно смешивают питательную среду с посевным материалом легким вращательным движением чашки по поверхности стола, после чего чашки Петри оставляют на горизонтальной поверхности до застывания агара. Когда среда застынет, засеянные чашки Петри помещают в термостат.

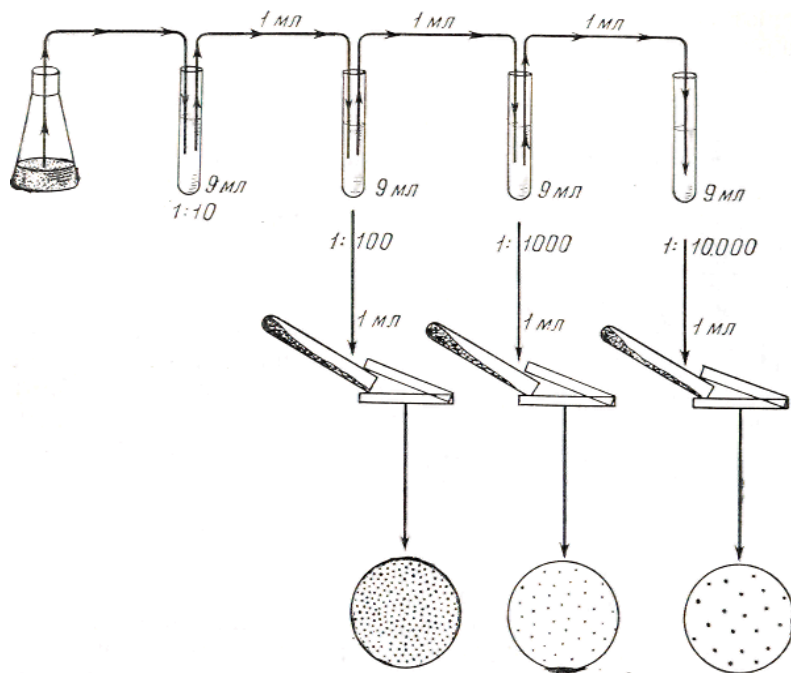


Рис. 16. Схема приготовления разведений суспензии микроорганизмов и проведения посева глубинным способом

Для определения количества клеток анаэробных микроорганизмов чашки Петри с плотной средой после того, как произведен посев, помещают в анаэроостаты. Иногда для определения числа некоторых анаэробов плотную среду после засева оставляют в пробирках. Поверхность застывшей среды заливают парафином или той же стерильной средой. В этом случае для лучшего рассмотрения колонии микроорганизмов среды рекомендуют осветлять.

**Подсчет выросших колоний.** Колонии бактерий подсчитывают обычно через 3 суток, колонии грибов и дрожжей – через 5–7, а актиномицетов – через 7–10 суток инкубации в термостате. В случае поверхностного посева определяют суммарное число колоний, выросших на трех чашках Петри. Результаты параллельных высевов из одного и того же разведения суспензии суммируют и определяют среднее число колоний, выросших при высевах из данного разведения. Колонии, как правило, подсчитывают, не открывая чашек Петри, и для удобства отмечают просчитанную колонию точкой на наружной стороне дна чашки, пользуясь чернилами или карандашом по стеклу. При большом количестве выросших колоний дно чашки Петри делят на секторы, подсчитывают количество колоний в каждом секторе и результаты суммируют.

### **Техника посева микроорганизмов из пробирки в пробирку**

Посев (или пересев) всегда проводят вблизи горелки. При посеве клеток микроорганизмов из пробирки в пробирку обе пробирки (одну – с культурой, другую – со стерильной питательной средой) берут в левую руку. Одну пробирку (первую) зажимают между указательным и средним пальцами. Нижний конец ее свободно лежит на большом пальце (с его левой стороны). Вторую пробирку зажимают между средним и безымянным пальцами. Она должна лежать параллельно первой. Ее нижний конец располагается с правой стороны большого пальца. Большой палец, находясь между пробирками, должен быть в естественном, ненапряженном состоянии и слегка удерживать пробирки в параллельном по отношению друг к другу положении.

При взятии мазка пробирки должны находиться в наклонном положении, гарантирующем стерильность культуры. При вертикальном расположении пробирок возможно попадание из воздуха посторонних клеток микроорганизмов.

В пламени горелки тщательно обжигают бактериологическую иглу (петлю), держа ее в правой руке в отвесном положении. Мизинцем правой руки вынимают из второй пробирки ватную пробку и зажимают ее между мизинцем и ладонью. Пробку первой пробирки зажимают между безымянным и средним пальцами правой руки. Снова слегка обжигают иглу и вводят ее в пробирку с культурой. Платиновая игла остывает очень быстро. Легким прикосновением ее к колонии микроорганизмов берут небольшое количество микробной массы и переносят во вторую пробирку.

При высевах в плотную скошенную среду иглой с культурой легким движением, не повреждая среды, проводят прямую или волнообразную черту по ее поверхности – посев штрихом.

При посеве в столбик питательной среды иглу вводят в толщу ее центральной части (посев уколом). При посеве в жидкую среду (или из жидкой среды) лишь слегка наклоняют пробирки, чтобы избежать смачивания пробок и краев пробирок.

Пробки, перед тем как ими закрыть пробирки, обжигают в пламени. Удобнее сначала закрыть первую пробирку, затем – вторую.

**Определение количества клеток методом высева в жидкие среды (метод предельных разведений).** Сущность метода состоит в следующем. В пробирки с жидкой средой вносят строго измеренный объем из различных разведений исследуемой суспензии микроорганизмов (рис. 17).

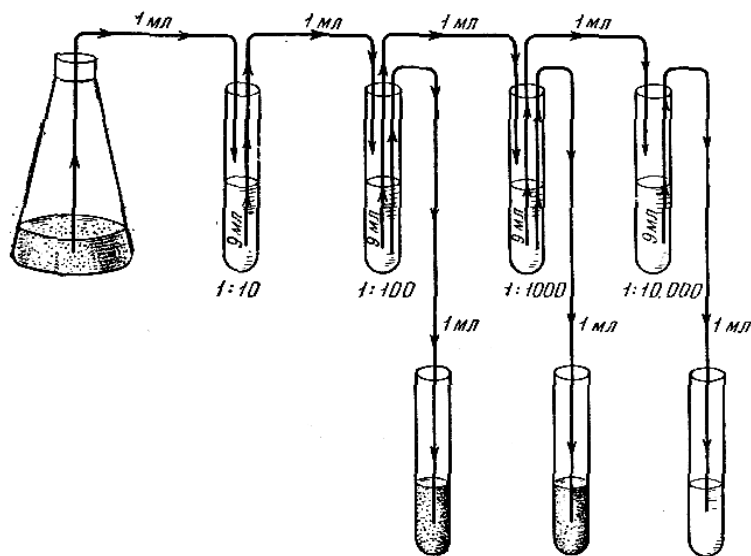


Рис. 17. Схема приготовления разведений суспензии микроорганизмов и проведения посева в жидкую среду

После инкубации, в зависимости от числа пробирок, в которых наблюдался или отсутствовал рост, считают число клеток, содержащихся в 1 мл суспензии. Метод предельных разведений нашел широкое применение для подсчета количества микроорганизмов, которые плохо или совсем не развиваются на плотных питательных средах. Этим же методом учитывают количество микроорганизмов, относящихся к той или иной физиологической группе. Необходимо помнить, что чашечный метод определения количества клеток обеспечивает большую точность по сравнению с методом предельных разведений.

Определение количества микроорганизмов методом предельных разведений включает приготовление разведений, посев в жидкую среду, регистрацию наличия или отсутствия роста после инкубации и расчет наиболее вероятного числа клеток в единице объема исходного субстрата.

*Приготовление разведений.* Разведения исходной суспензии готовят точно так же, как и для чашечного метода.

*Посев в среду и регистрация результатов.* При посеве питательную среду, благоприятную для развития учитываемых форм, предварительно разливают в пробирки (колбы) и стерилизуют. В пробирки (колбы) следует наливать одинаковый объем воды. Посев проводят обычно из каждого разведения или из 4–5 последних, причем каждое разведение высевают в 3–5 параллельных пробирок.

Количество посевного материала должно быть везде одинаковым (как правило, 1 мл). Затем пробирки помещают в термостат. Время инкубации может колебаться от 3 до 10 суток и зависит от интенсивности роста форм, численность которых определяют. После инкубации регистрируют наличие или отсутствие роста микроорганизмов визуально (помутнение среды, образование пленки, осадка, газовыделение) или проводят качественные реакции на присутствие определенных соединений в среде, образование которых должно сопровождать развитие учитываемых микроорганизмов (например, появление в среде нитритов при развитии нитрифицирующих бактерий).

*Хранение микроорганизмов.* При длительном хранении в лабораторных условиях могут измениться отдельные физиолого-биохимические или морфологические особенности микроорганизмов. Чтобы избежать этого, необходимо хранить культуру чистой и в жизнеспособном состоянии.

Традиционный метод хранения – пассирование (субкультивирование), т. е. пересев на свежие питательные среды с временными интервалами в зависимости от вида микроорганизма, среды и условий хранения. Одни виды микроорганизмов требуют частых пересевов, другие можно не пересевать более месяца. В процессе такого хранения нельзя допускать пересыхания среды. Для этого пробирки с культурами рекомендуют обертывать бумагой или пленкой и хранить в условиях, когда процессы жизнедеятельности заторможены, например, в холодильнике при температуре 5–8°C.

Существует ряд других способов хранения культур: под слоем стерильного вазелинового масла; в ампулах с жидким азотом; в лиофилизированном состоянии, т. е. высушенными из замороженного состояния. Спорообразующие бактерии могут храниться годами в стерильной сухой почве или соответствующей среде.

### ***Работа в лаборатории***

Работа выполняется группой в количестве трех человек. Каждому студенту в группе необходимо проинформировать посев одной из накопительных культур: протей, сенной или картофельной палочек.

### ***Контрольные вопросы***

1. Как классифицируют микроорганизмы по отношению к температуре?
2. Как действуют на микробы низкие и высокие температуры?
3. Как подразделяют микроорганизмы по отношению к влаге?
4. Какое практическое значение имеет высушивание для хранения продуктов питания?
5. Влияние УФ-излучения на микроорганизмы.
6. Какова сущность процесса гниения и его основные стадии?
7. Каковы особенности процессов гниения в аэробных и анаэробных условиях?
8. Каковы микроорганизмы, вызывающие процессы гниения? Дайте им характеристику.
9. Роль процессов гниения в природе.
10. Какие продовольственные товары могут быть подвержены гниению?

### **Работа 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РОДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ПО КУЛЬТУРАЛЬНЫМ И МОРФОЛОГИЧЕСКИМ ПРИЗНАКАМ ВЫДЕЛЕННЫХ В ЧИСТУЮ КУЛЬТУРУ МИКРООРГАНИЗМОВ**

***Цель работы:*** изучить культурально-морфологические свойства чистых культур протей, сенной и картофельной палочек.

## Материальное обеспечение

1. Микроскопы.
2. Предметные и покровные стекла.
3. Бактериологические петли.
4. Спиртовки, спички.
5. Набор красок для окрашивания по Граму.

### Задание 1. Изучение чистых культур протeya, картофельной и сенной палочек

#### *Изучение характера роста чистой культуры протeya, сенной и картофельной палочек на косячке МПА и описание их культуральных свойств*

Культуральные свойства исследуют невооруженным глазом. Однородный слой бактерий на поверхности среды свидетельствует о ее чистоте, т. е. о содержании на среде бактерий одного вида. Культуральные свойства опишите в соответствии с пунктом 1 задания 1 работы 3.

*Bacillus subtilis* (от лат. *sub* – внутри или под, *tilia* – липа, трава, луб; впервые выделена из сена) – сенная палочка. Колонии сухие, мелкоморщинистые, бархатистые; бесцветные или розовые; срастающиеся с агаром; край колоний волнистый или слегка волнистый. Палочки короткие тонкие (3–5×0,9 мкм). Споры овальные (0,9×0,6 мкм), расположены не строго центрально, на некоторых средах ближе к центру. Клетки подвижные (перитрихи).

*Bacillus mesentericus* – картофельная палочка (рис. 18). Название связано не с картофелем, а с картофельной болезнью хлеба, которую она вызывает. Появляется картофельная палочка на качественном пшеничном хлебе при хранении его в течение нескольких дней в теплом месте при повышенной влажности, вызывая разрушение белковых веществ и крахмала. При ее интенсивном развитии внешние признаки мякиша изменяются: при разломе он становится тягучим и липким, появляется затхло-гнилостный, иногда с примесью сладковатого, запах. Колонии на МПА тонкие, сухие, морщинистые, серовато-белые. Палочки тонкие, длинные и короткие, подвижные (3–10×0,5–0,6 мкм); иногда они соединены в длинные нити. Споры овальные и продолговатые (0,9–0,5 мкм). При формировании спор клетки не меняют палочковидной формы. Прорастание спор экваториальное.

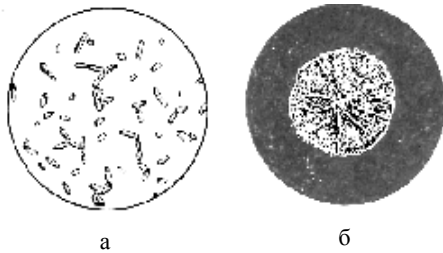


Рис. 18. Культура сенной палочки: а – палочки и овальные споры; б – колония

#### *Изучение морфологических свойств чистых культур*

Для исследования *морфологических свойств* отбирают бактериологической петлей часть культуры и окрашивают по Граму фиксированный мазок. Однородная культура в 10 просмотренных полях зрения свидетельствует о чистоте выделенных бактерий.

Опишите морфологические признаки, учитывая особенности, перечисленные в пункте 2 задания 1 работы 3.

### Работа в лаборатории

Изучите культурально-морфологические свойства чистых культур протeya, сенной и картофельной палочек, сравните их со свойствами накопительных культур и сделайте выводы об идентичности бактерий.

### Задание 2. Определение подвижности культур микроорганизмов

Для определения подвижности культур готовят препарат «висячая капля» из культуры, выращенной на скошенном МПА и просматривают под микроскопом с объективом 8× и 40×. Отмечают наличие или отсутствие подвижности. Подвижные клетки интенсивно передвигаются в поле зрения микроскопа в разных направлениях с помощью жгутиков (рис. 19). Неподвижные клетки могут перемещаться под влиянием броуновского движения (пассивное перемещение в виде беспорядочных колебаний в небольших пределах).

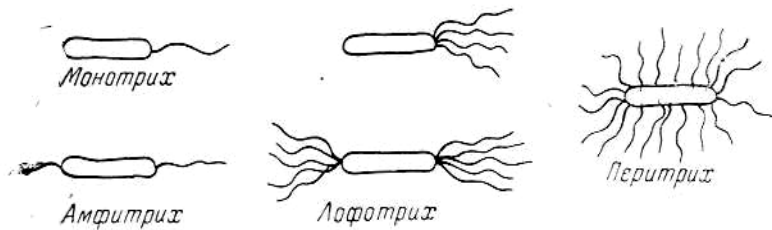


Рис. 19. Типы жгутикования у бактерий

Изучение совокупности культуральных, морфологических и физико-биохимических свойств позволяет определить принадлежность микроорганизмов к определенному семейству, роду и виду.

Вид – это совокупность микроорганизмов, имеющих общее происхождение, общие наследуемые признаки и приспособившихся к определенной среде обитания.

### Работа в лаборатории

Определите подвижность микроорганизмов.

### Задание 3. Ознакомление с определителями бактерий

Под общим понятием «бактерии» описано свыше 1600 видов микроорганизмов-прокариот, не имеющих настоящего сложноорганизованного ядра. Большинство представителей бактерий – одноклеточные организмы, различающиеся размерами и физиологическими свойствами. По форме все бактерии можно разделить на шаровидные (или кокки), палочковидные, извитые и нитчатые. Из почвы выделены также бактерии, имеющие довольно своеобразную форму.

Основные формы бактерий представлены на рис. 20.

*Шаровидные бактерии, или кокки* (от греч. *kokkos* – зерно, шарик), делятся на следующие группы:

1. Микрококки (от лат. *micro* – маленький). В природе встречаются в виде одиночных шаровидных клеток. Примером могут служить клетки *Micrococcus agilis* (от лат. *agilis* – подвижный).

2. Диплококки (от греч. *diploos* – двойной) – шаровидные бактерии, соединенные по двое. К ним относится *Azotobacter chroococcum*. Родовое название этих бактерий отражает их способность фиксировать азот атмосферы, видовое – продуцировать коричневый пигмент (от лат. *chroo* – коричневеющий).

3. Стрептококки (от греч. *streptos* – цепь) – шаровидные бактерии, образующие в результате деления клеток в одной плоскости разнообразной длины цепочки. К роду стрептококков относятся в основном патогенные бактерии. Но стрептококковую форму имеют многие молочнокислые бактерии рода лактококкус. Поэтому с этой формой бактерий знакомятся при изучении молочнокислого брожения на примере *Lactococcus lactis*.

Родовое и видовое названия этих бактерий, образующих короткие цепочки, отражают их причастность к молочнокислому брожению (от лат. *lactis* – молочный).

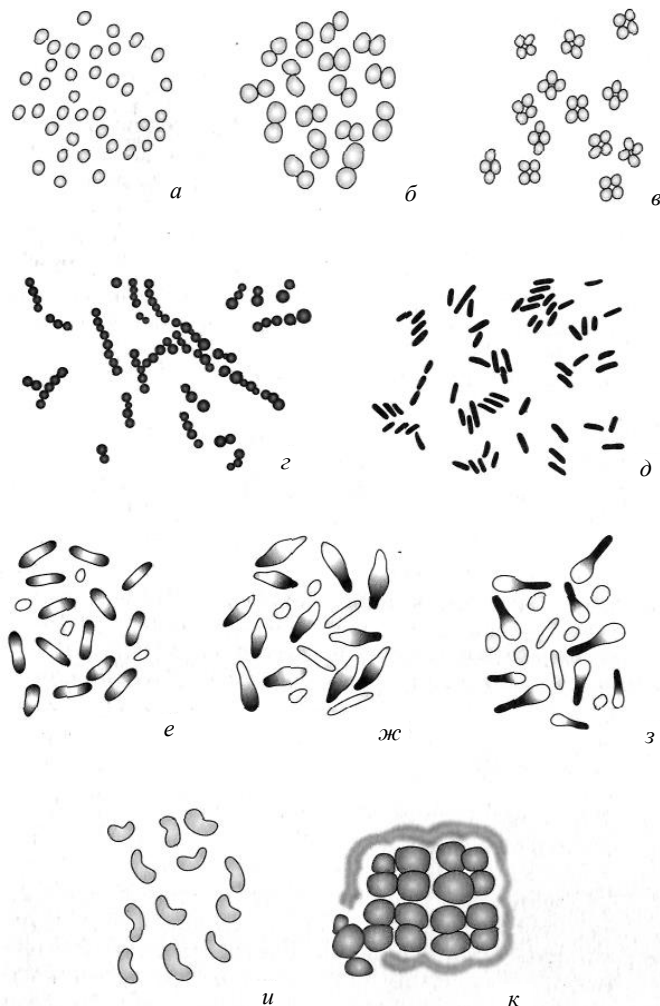


Рис. 20. **Форма бактерий:** шаровидная: а – микрококки; б – диплококки; в – тетракокки, сарцины; г – стрептококки; палочковидные: д – не образующие спор; е, ж, з – спорообразующие (е – бациллярный, ж – клостридиальный, з – плектридиальный типы спорообразования); извитая: и – вибрионы, к – сарцина (увеличение 12 000 раз)

4. Сарцины (от лат. *sarceo* – соединяю) – шаровидные бактерии, группирующиеся по 8 клеток, располагаются в виде куба, с каждой стороны которого по 4 клетки. Такая форма возникает в результате деления клетки в трех взаимно перпендикулярных плоскостях. Некоторые виды сарцин формируют большие сарциноподобные кубообразные пакеты, в которых с каждой стороны находится уже не по 4 клетки (субъединицы сарцины), а по 4 сарцины. Удобна для просмотра *Sarcina flava* (сарцина желтая) – наиболее распространенный представитель микрофлоры воздуха.

Все шаровидные формы бактерий, за исключением *Lactococcus lactis*, просматривают на фиксированных и окрашенных фуксином препаратах.

**Палочковидные бактерии.** К ним относят формы, образующие споры (роды *Bacillus*, *Clostridium* и др.) и не образующие их (роды *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Lactobacillus* и др.).

Цитоплазма клеток *Pseudomonas stutzeri* прокрашивается равномерно, поскольку это неспорообразующая палочка, и под микроскопом клетки выглядят как тонкие, четко очерченные, равномерно окрашенные палочки.

С представителями палочковидных бактерий, образующих споры, можно познакомиться на примере *Bacillus mycoides* или *Bacillus mesentericus*. В названии первого вида отражена его способность развиваться на питательных средах в виде ложногрибовидного налета (от лат. *mycoides* – грибовидный), напоминающего мицелий грибов.

Поскольку *Bacillus mycoides* – спорообразующая палочка, цитоплазма клетки, приступившей к спорообразованию, прокрашивается красителем, а спорогенная зона – нет. Поэтому под микроскопом бацилла выглядит неравномерно окрашенной. Спорогенная зона, как более плотная и непрокрашенная, иначе преломляет свет, чем цитоплазма клетки. Клетки *Bacillus mycoides* относятся к стрептобациллам, так как обычно располагаются цепочками. Для просмотра лучше брать двух-трехсуточную культуру (в более позднем возрасте клетки переходят в стадию спорообразования). *Bacillus mesentericus* (картофельная палочка) также относится к стрептобациллам.

Палочковидные бактерии просматривают на фиксированных и окрашенных фуксином препаратах.

**Нитчатые формы.** Представляют собой цепочки цилиндрических клеток, часто окруженные общим влагалищем, или чехлом. Нитчатые бактерии распространены в почве и водоемах, особенно с высоким содержанием железа. В водоемах эти бактерии часто образуют охристые осадки.

Для знакомства с нитчатыми бактериями рекомендуется брать пробу воды с охристыми отложениями из естественных водоемов. Препарат готовят в раздавленной капле и просматривают с иммерсионной системой. Наиболее часто на нем встречаются железобактерии рода *Leptothrix*, окисляющие закисные формы железа в окисные. Гидрат окиси железа откладывается во влагалищах, отчего они имеют желтовато-бурую (охристую) окраску. Размножается *Leptothrix* делением концевой (молодой) клетки, обращенной внутрь влагалища. При этом старые клетки оттесняются (выталкиваются) молодыми; нить и влагалище в результате размножения и роста клеток удлиняются. Нередко старые клетки отчлениваются от общей нити. На препарате часто обнаруживаются остатки ожелезненных чехлов (в виде тонких трубок) и другие ожелезненные структуры.

Для выявления вегетативных клеток железобактерий пробу берут непосредственно из охристых осадков, препарат фиксируют 96%-ным спиртом, обрабатывают 1%-ным раствором HCl (для обесцвечивания влагалищ) и окрашивают в течение суток эритрозином. Влагалища клеток на таком препарате бесцветны, а вегетативные клетки и гонидии красные. Гонидии – образования овальной или округлой формы, в некоторых случаях имеющие жгутики. Гонидии формируются у нитчатых бактерий, которым свойственна дифференциация нити.

**Извитые формы.** Среди бактерий данной группы выделяют следующие формы:

1. Вибрионы (от лат. *vibrare* – извиваться, дрожать) – слегка изогнутые клетки; изгиб их меньше половины окружности.

2. Спириллы (от лат. *spiro* – штопор). В отличие от вибрионов их клетки более длинные, толстые и извитые (извитость или равна, или больше половины окружности). Спириллы могут иметь один завиток в виде русской буквы С, два завитка в виде латинской буквы S или несколько – в виде спирали.

3. Спирохеты – длинные и тонкие клетки с большим количеством мелких, но крутых завитков; длина клеток превышает их толщину в 5–200 раз.

Вибрионы и спириллы удобно просматривать на фиксированном и окрашенном фуксином препарате, приготовленном из навозной жижи, предварительно инкубированной в течение нескольких суток в термостате. На таком препарате много клеток разных видов микроорганизмов, среди них часто встречаются извитые формы.

Для ознакомления со спирохетами следует приготовить фиксированный крашенный препарат зубного налета. Особенно удачны препараты соскоба с кариесного (гнилого) зуба. Зубные спирохеты чрезвычайно тонкие, почти волосовидные, короткие (всего 2–3 завитка).

**Миксобактерии, или скользкие бактерии.** Это группа бактерий, стоящих на более высокой ступени эволюционного развития, чем описанные выше. У отдельных представителей миксобактерий (*Sorangium*, *Polyangium*) даже в световой микроскоп четко видно дифференцированное ядро. Вегетативные клетки имеют палочковидную форму с заостренными или округлыми концами. По мере старения они укорачиваются и переходят в миксоспоры, соединяющиеся впоследствии слизью и образующие первичные и вторичные цисты. Из последних в дальнейшем формируются плодовые тела.

Для ознакомления рекомендуется «Краткий определитель бактерий Берджи».

Результаты проведенных исследований культурально-морфологических свойств чистых культур запишите по форме табл. 2.

Таблица 2. Культурально-морфологические свойства чистых культур

Морфологические свойства			Культуральные свойства (характеристика колоний)					
форма, расположение, споры	окраска по Граму	подвижность	величина	форма	подвижность	цвет	край	консистенция

### Контрольные вопросы

1. Какие химические факторы оказывают влияние на микробную клетку?
2. Что такое асептика, антисептика, дезинфекция?
3. Каков механизм действия ядовитых веществ на клетку микроорганизмов?
4. Какими бывают взаимоотношения между микроорганизмами?
5. Что такое антибиотики? Какова их классификация?
6. В чем заключается эффект действия фитонцидов на микроорганизмы и от чего он зависит?
7. Что такое чистая культура? Как она выделяется?
8. Каково определение вида микроорганизмов? Для какой цели определяют вид?
9. Какие морфологические и культуральные признаки используются для определения вида бактерий?
10. Классификация питательных сред и требования, предъявляемые к ним.

## Работа 5. ИЗУЧЕНИЕ БОЛЕЗНЕЙ ПЛОДОВ И ОВОЩЕЙ, ПРОДУКТОВ ИХ ПЕРЕРАБОТКИ, ВЫЗЫВАЕМЫХ МИКРООРГАНИЗМАМИ

**Цель работы:** изучить возбудителей болезней плодов и овощей и продуктов их переработки, а также их признаки.

### Материальное обеспечение

1. Микроскопы.
2. Предметные стекла.
3. Реактивы.
4. Бактериальные петли.
5. Иглы.
6. Натуральные образцы.
7. Каталоги.

Свежие плоды и овощи обильно обсеменены микробами. Микроорганизмы попадают на них из почвы, воздуха, с семенами и т. д.

Плоды и овощи являются живыми организмами и обладают способностью противостоять воздействию микроорганизмов. Их иммунитет обусловлен высокой кислотностью сока мякоти, наличием веществ, обладающих фитонцидными свойствами, особым строением кожицы. Если кожица не повреждена, то на ее поверхности могут существовать и размножаться немногие виды микроорганизмов, составляя так называемую эпифитную микрофлору. Там же могут находиться и другие микробы, способные вызывать болезни плодов и овощей, – фитопатогенные микроорганизмы.

При нарушении целостности покровов плодов и овощей для микробов создается доступ к питательным веществам тканей и развивается процесс порчи (рисунки 21–27). Поражению плодов и овощей способствуют также неправильные способы заготовки, перевозки и хранения.

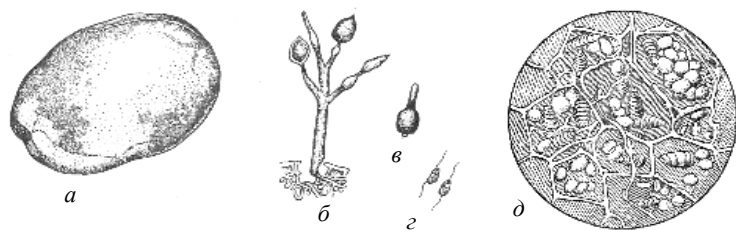


Рис. 21. Фитофтороз картофеля: а – пораженный клубень (продольный разрез); б – спорангионосец со спорангиями; в – прорастающий спорангий; г – зооспора; д – мицелий фитофторы в клубне



Рис. 22. Фитофтороз плода томатов

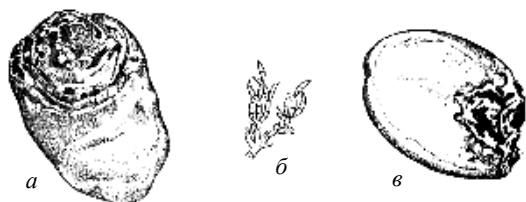


Рис. 23. Фузариоз (сухая гниль) картофеля: а – пораженный клубень; б – споры; в – клубень в разрезе



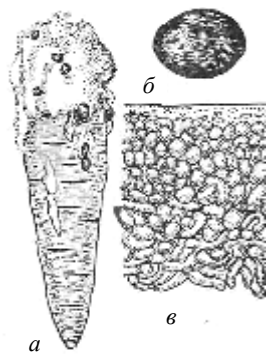


Рис. 24. Белая гниль моркови: а – поражение грибом *Sclerotinia*; б – склероций (внешний вид), в – склероций (разрез)

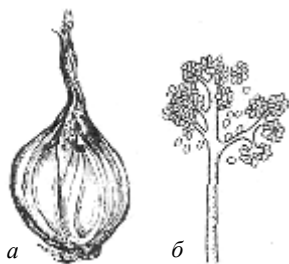


Рис. 25. Шейковая гниль лука: а – пораженная луковича; б – конидиеносец с конилиями паразита

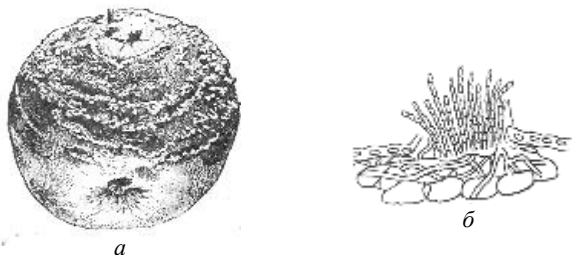


Рис. 26. Плодовая гниль: а – пораженное яблоко; б – конидиальное спороношение монилии

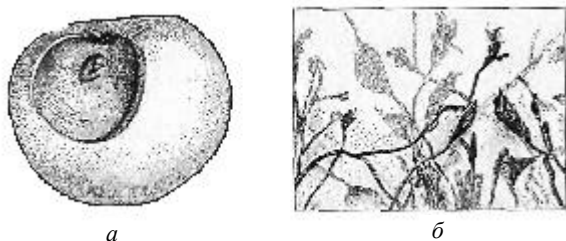


Рис. 27. Мягкая зеленая гниль: а – пораженное яблоко; б – конидиеносцы пеницилла

Обычно порча начинается с развития плесневых грибов, так как кислая среда сока для них благоприятна. Затем развиваются бактерии. Пораженные плесневыми грибами плоды и овощи покрываются налетом из грибницы и органами спороношения, приобретают различную окраску (белую, черную, зеленую), позднее они разлагаются по типу сухой и мокрой гнили. При бактериальном заражении налетов не образуется, а пораженная ткань превращается в мокрую кашицеобразную дурно пахнущую массу.

### Задание 1. Макроскопические методы определения диагноза заболевания

*Макроскопические методы* – внешнее описание поражений, которые объединяют в типы: пятнистость, гниль, налеты, наросты, образование язв.

Пятнистость встречается на листьях, стеблях, плодах. Вызывается она различными паразитами: бактериями, грибами, вирусами. Пятна различаются по форме, величине, окраске, характеру перехода от зараженной части к здоровой. Примерами таких заболеваний может служить фитофтороз помидоров, коккомикоз косточковых плодов.

Гниль характеризуется мацерацией (разложением) тканей и разрушением клеточных оболочек. Разложение по типу сухой гнили характеризуется превращением пораженной ткани в загнившую, но плотную, твердую и сухую массу, которая впоследствии сморщивается и высыхает. Сухие гнили вызываются чаще плесневыми грибами. Примером может служить сухая фузариозная гниль картофеля. Мокрая гниль вызывается бактериями, при этом ткани размягчаются, ослизняются, неприятно пахнут.

Налет развивается на пораженных органах плодов и овощей, состоит из мицелия и органов спороношения грибов.

Наросты на растениях вызываются раздражающим действием определенных видов бактерий и грибов, которые в отличие от всех других паразитов не только не разрушают ткани, а вызывают бурное разрастание и беспорядочное деление растительных клеток, например, рак клубней картофеля.

При язвах на поверхности растений образуются углубления или корочки с неровными краями, иногда содержащие органы спороношения грибов. Болезни с такими поражениями поверхности тканей называют паршой (обыкновенной, порошистой, бугорчатой).

## **Задание 2. Микроскопические методы определения диагноза заболевания**

Перед микроскопированием плоды и овощи осторожно обтирают чистой тканью, осматривают и с пораженных участков берут материал для исследований. При наличии налета плесневых грибов его с частью пораженной ткани переносят препаровальной иглой на предметное стекло и готовят препарат «раздавленная капля». В препарате изучают строение мицелия, плодового тела, цвет и форму спор. Если плодовые тела не созрели, то изучаемые объекты помещают во влажную камеру до образования органов спороношения. В случае необходимости готовят окрашенные препараты.

После описания внешних признаков поражения и микроскопического исследования препаратов, пользуясь определителем болезней растений, изучают методику определения фитопатогенных заболеваний плодов и овощей.

### ***Работа в лаборатории***

1. Опишите и зарисуйте наиболее распространенные заболевания плодов и овощей, используя натуральные образцы, муляжи, альбомы.

2. Из пораженных участков приготовьте препараты «раздавленная капля», изучите под микроскопом и зарисуйте строение мицелия и плодовых тел, возбудителей болезней.

3. С помощью наглядных пособий установите 2–3 диагноза заболеваний плодов и овощей (по указанию преподавателя).

### ***Контрольные вопросы***

1. Каким образом идентифицируется наличие кишечной палочки?

2. Для чего при определении титра кишечной палочки в пищевых продуктах проводят идентификацию видов?

3. Что такое эпифитная микрофлора растений?

4. Что такое фитопатогенные микроорганизмы?

5. Какие плесневые грибы поражают плоды и овощи?

6. По каким признакам отличаются заболевания бактериального характера от заболеваний, вызываемых плесневыми грибами?

7. Как подразделяются типы поражений по внешним признакам?

8. Как влияют на поражение фитопатогенными микроорганизмами условия хранения плодов и овощей?

9. Какими болезнями поражаются картофель, морковь, лук, капуста, яблоки, виноград, цитрусовые плоды?

## **Работа 6. ИЗУЧЕНИЕ МИКРОФЛОРЫ МОЛОКА И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ**

**Цель работы:** сделать отбор проб и провести микробиологические исследования молока и молочных продуктов.

### ***Материальное обеспечение***

1. Микроскопы.

2. Стерильные пробирки.

3. Стерильная вода.

4. Чашки Петри.

5. Среда Эндо.
6. Среда Кесслера.
7. Стерильные пипетки.
8. Ватные тампоны.
9. Молоко, молочные продукты.

Молочнокислые бактерии вызывают брожение сахаров, в результате которого в среде накапливается молочная кислота. Некоторые из бактерий обитают в почве, на растениях, для других естественной средой является молоко животных.

По морфологии молочнокислые бактерии делятся на две подгруппы: кокки и палочки. Они неподвижны, не образуют спор, палочки часто имеют зернистое строение клетки (метахроматические зерна). Молочнокислые бактерии – факультативные анаэробы, по методу Грама красятся положительно. Среди видов молочнокислых бактерий различают термофильные и мезофильные расы.

Типичные молочнокислые бактерии подразделяют на бактерии гомоферментативного и гетероферментативного брожения. При гомоферментативном брожении сахар сбраживается почти полностью в молочную кислоту. Бактерии гетероферментативного брожения, кроме молочной кислоты, образуют летучие жирные кислоты (уксусную, пропионовую), углекислый газ, ароматообразующие вещества (диацетил, эфиры) и др.

Молочнокислые бактерии растительного происхождения сбраживают различные дисахара, гексозы и пентозы. Они осуществляют молочнокислое брожение при квашении овощей, приготовлении теста, кваса, силосовании кормов, созревании сельди и т.д. Представителями этой группы являются палочковидные формы – бактерии *Delbrucki* (Дельбрюкка), *Bacillus cucumeris fermentati*, *Bacillus brassicae fermentatae* и шаровидные формы – бетакокки.

Молочнокислые бактерии, естественной средой которых является молоко животных, сбраживают лактозу, глюкозу и галактозу. Их формы приведены ниже.

*Молочнокислые кокки* образуют до 1–1,2% молочной кислоты в растворе. На питательной среде сусло-агар-мел вокруг растущей колонии образуется зона просветления – результат растворения мела кислотой. Колонии молочнокислых кокков на агаре мелкие, округлые. Основными их представителями являются:

- молочнокислый стрептококк (*Streptococcus lactis*), наблюдаемый чаще в виде парных овально-круглых клеток;
- сливочный стрептококк (*Streptococcus cremoris*) в виде цепочки круглых или овальных клеток;
- ароматообразующие стрептококки (*Streptococcus citrovorus*, *Streptococcus paracitrovorus*, *Streptococcus diacetylactis*) в виде цепочек округлых клеток.

*Молочнокислые палочки* образуют до 3–4% молочной кислоты в растворе. Некоторые бактерии этой группы выделяют при брожении углекислоту и летучие кислоты, растут в толще питательной среды. Основные представители молочнокислых бактерий следующие:

- сырная палочка (*Lactobacillus casei*);
- болгарская палочка (*Lactobacillus bulgaricus*);
- ацидофильная палочка (*Lactobacillus acidophilus*);
- кавказская палочка (*Betabacterium caucasicum*).

На сывороточном агаре колонии молочнокислых палочек напоминают кусочки ваты, волосистые пучки или имеют вид чечевичек с отростками. Некоторые расы склонны к слизиобразованию.

В свернувшемся молоке все типичные молочнокислые бактерии (кокки и палочки) образуют плотный сгусток без газовых выходов.

*Молочные дрожжи* сбраживают лактозу. Продукты брожения (спирт и углекислота) обуславливают пенящуюся структуру и острый вкус. Форма клеток овально-округлая. Представителями молочных дрожжей являются:

- сахаромицес лактис (*Saccharomyces lactis*);
- сахаромицес фрагилис (*Saccharomyces fragilis*);
- торулопсис кефир (*Torulopsis kefir*);
- торулопсис сферика (*Torulopsis sphaerica*).

### Задание 1. Отбор пробы

Микробиологическое исследование молочных продуктов производят в срок до четырех часов с момента отбора пробы.

*Проба из продуктов жидкой консистенции* берется следующим образом: ложкой размешивают содержимое тары, пипеткой набирают среднюю пробу (100–50 мл) в посуду, закрывают пробкой, обертывают бумагой.

Для *отбора пробы из продуктов полужидкой консистенции* ложкой снимают верхний слой продукта толщиной 1–2 см и помещают его в посуду. Другой ложкой размешивают все содержимое мелкой тары,

берут среднюю микробиологическую пробу (50 мл) в отдельную посуду, закрывают пробкой, обертывают бумагой.

От расфасованных продуктов отбирают образец в упаковке. Пробу охлаждают до 6°C. С поверхности нерасфасованного мороженого стерильной ложечкой снимают слой толщиной не менее 2,5 см, затем стерильно отбирают 50 г. От расфасованного мороженого берут 1–2 образца, снимают упаковку и помещают продукт в стерильную склянку с притертой или ватной пробкой. Перед исследованием склянку с образцами нагревают 10–15 мин на водяной бане при температуре 40–45°C. Поверхность сыра в месте отбора пробы прижигают раскаленным ножом.

Пробу творога, сыра и масла отбирают стерильным щупом из 2–3 мест тары на расстоянии 3–5 см от ее края, щуп опускают на  $\frac{3}{4}$  его длины. Из щупа берут стерильным шпателем около 20 г продукта в стерильную банку с притертой или ватной пробкой. Перед исследованием 10 г творога (сыра) растирают в стерильной фарфоровой ступке, постепенно добавляют 100 мл стерильной воды, подогретой до температуры 45°C, и все сливают в стерильную колбочку. Пробу масла в банке расплавляют на водяной бане, нагретой до температуры 40–45°C, и перемешивают до получения однородной эмульсии.

При микробиологическом анализе молочных продуктов определяют общее количество микроорганизмов в 1 г или 1 мл продукта и титр кишечной палочки.

Для определения *общего количества микроорганизмов* применяют чашечный метод посева с предварительным количественным разведением (табл. 3).

Таблица 3. Стандартные разведения

Продукты	Разведение
Молоко и сливки сырые	1:10 000, 1:10 000
Масло сладко-сливочное (анализ производится на предприятиях промышленности)	1:100, 1:1 000, 1:10 000
Молоко и сливки пастеризованные, молоко солодовое, суфле	1:10, 1:100, 1:1 000
Молоко сгущенное с сахаром	1:10, 1:100, 1:1 000
Какао и кофе со сгущенным молоком	1:10, 1:100, 1:1 000
Сухое молоко и сухие сливки с сахаром и без него	1:100, 1:1 000

Из каждого разведения засевают в чашки по 1 мл. Посевы заливают теплым питательным агаром (гидролизированным обратом, молочносыворотным агаром) и термостатируют 48 часов при температуре 37°C. Количество выросших колоний пересчитывают на 1 мл или 1 г продукта.

Количественный анализ микрофлоры молочных продуктов, не подвергнутых термической обработке, можно производить методами Брида, редуктазы и предельных разведений.

### **Микроскопирование молочнокислых бактерий**

Если простоквашу хранить при комнатной температуре, то на ее поверхности появляется белая или кремовая бархатистая морщинистая пленка. Такая же пленка обычно бывает на поверхности рассола при квашении огурцов, капусты и других овощей. Это молочная плесень – *Geotrichum candidum* (*Oidium lactis*), которая всегда сопутствует молочнокислому брожению, являясь его нежелательным спутником. Она окисляет молочную кислоту, образуемую молочнокислыми бактериями, до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O, снижая кислотность среды. В результате кисломолочные и квашеные продукты начинают портиться, так как в среде происходит развитие гнилостных бактерий.

Молочная плесень – аэробная форма, поэтому развивается только на поверхности. Имеет многоклеточный мицелий, который распадается на отдельные клетки, так называемые оидии, по форме напоминающие дрожжи и служащие для размножения.

Для микроскопических наблюдений за молочнокислыми бактериями готовят препарат из прокисшего молока. Бактериологическую петлю вводят в сгусток и, повернув вокруг оси, извлекают, прикасаясь ею к пленке, которую образует молочная плесень. Сгусток размазывают по предметному стеклу очень тонким слоем без воды. Сушат на воздухе. Фиксируют смесью спирта с эфиром (приблизительно 1:1), несколько раз нанося смесь на мазок и сливая ее. При такой фиксации не только погибают и прикрепляются к стеклу бактерии, но и с помощью эфира извлекается и удаляется жир, капли которого на препарате мешают окраске и микроскопированию.

Фиксированный препарат окрашивают метиленовым синим 2–3 мин, промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсией. Метиленовый синий – лучший краситель для молочнокислых бактерий молока, так как он слабо окрашивает основной фон (казеин) и хорошо – клетки микроорганизмов. На препарате преобладают мелкие округлые клетки *Lactococcus lactis*, соединенные в короткие цепочки. Эта бактерия – возбудитель естественного скисания молока в средних широтах. Оптимальная температура для ее развития 30°C. Она способствует накоплению в молоке до 1% молочной кислоты.

Нередко на препарате видны разных размеров тонкие палочки обычно правильной формы рода *Lactobacillus*, иногда содержащие зерна волютина. Чаше встречается *Lactobacillus bulgaricus* (рис. 28) – возбу-

дитель естественного скисания молока в южных широтах. Оптимальная температура развития болгарской палочки – 40°C, она кислотоустойчива, накапливает до 3,5% молочной кислоты. На плотных средах эта бактерия образует мелкие характерные колонии в виде комочков ваты, как правило, выпуклые, непрозрачные, непигментированные.

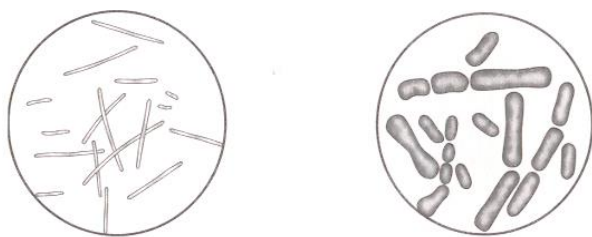


Рис. 28. Молочнокислые бактерии

Если на поверхности прокисшего молока появилась пленка, то в мазке обнаруживается также и молочная плесень. Прямоугольные или овальные клетки ее отличаются от молочнокислых бактерий большими размерами.

Можно приготовить также фиксированные препараты из кисломолочных продуктов (йогурта, кефира, ацидофилина, ряженки, бифидока и др.) и зарисовать доминирующие формы.

Препараты из силоса или квашеной капусты готовят следующим образом: сначала втирают в предметное стекло кусочки силосной массы (или капусты), подсушивают и фиксируют над пламенем горелки.

Остывший препарат окрашивают эритрозинем (он в отличие от фуксина не окрашивает растительные элементы). И в силосе, и в квашеной капусте преобладают тонкие, хорошо прокрашивающиеся палочки *Lactobacillus plantarum*.

## Задание 2. Метод редуктазы

Редуктаза – бактериальный фермент, способный восстанавливать метиленовый синий. Чем больше бактерий, тем больше выделяется редуктазы. Установлена зависимость между продолжительностью обесцвечивания метиленового синего и количеством микроорганизмов.

В стерильные пробирки наливают по 20 мл молока и 1 мл метиленового синего (концентрация метиленового синего: 5 мл насыщенного спиртового раствора синьки и 195 мл дистиллированной воды), закрывают их резиновыми пробками, встряхивают и термостатируют при температуре 40°C.

Результаты анализа определяют по табл. 4.

Таблица 4. Оценка качества молочных продуктов по результатам редуктазной пробы

Оценка качества молока	Содержание бактерий в 1 мл	Время обесцвечивания
Хорошее	Менее 500 тыс.	Не ранее 5,5 ч
Удовлетворительное	От 500 тыс. до 4 млн	От 2 до 5,5 ч
Плохое	От 4 до 20 млн	От 20 мин до 2 ч
Очень плохое	Свыше 20 млн	Менее 20 мин

При определении *титра кишечной палочки* производят количественное разведение продукта в стерильной воде. Для посева в зависимости от вида продукта применяют разное число пробирок с селективной средой Кесслера (табл. 5).

Таблица 5. Нормы количественных разведений молочных продуктов для определения титра кишечной палочки

Продукт	Разведение	Число пробирок каждого разведения
Молоко и сливки пастеризованные, молочные консервы, ацидофильное молоко и простокваша	1:1; 1:10	3
Масло	1:1; 1:10; 1:100; 1:1 000	2
Сыр	1:100; 1:1 000; 1:10 000; 1:100 000; 1:1 000 000	2

Посев 1 мл натурального продукта производят в пробирку со средой Кесслера и каждую отдельную пробирку среды – по 1 мл соответствующего разведения. Посевы в среде тщательно перемешивают, избегая образования пузырьков, термостатируют 48 ч при температуре 42–43°C.

### Микробиологическое исследование сухого молока

В сухом молоке должно содержаться меньше микроорганизмов, чем в свежем, так как происходит их массовая гибель в процессе изготовления молока. При сушке лучше сохраняются молочнокислые бактерии, которые могут быть жизнеспособными в готовом продукте месяцами. В процессе производства, при упаковке и в результате последующего хранения может происходить вторичное обсеменение сухого молока.

Согласно требованиям нормативных документов, в сухом молоке определяют общее количество микроорганизмов и присутствие кишечной палочки.

В 1 г сухого обезжиренного молока должно содержаться не более 50 тыс. микроорганизмов, в сухом молоке для детского питания – не более 2,5–3 тыс. Цельное сухое молоко по этому показателю делят на высший сорт (не более 50 тыс. микроорганизмов) и первый сорт (не более 70 тыс.).

Присутствие кишечной палочки в 0,1 г всех видов сухого молока не допускается.

Среднюю пробу для анализа отбирают из различных мест упаковки стерильной ложкой в количестве 50 г и помещают в стерильную сухую тару. Если сухое молоко расфасовано в банки или коробки, то от каждой партии отбирают два образца в оригинальной упаковке.

Для определения общей микробной обсемененности 1 г сухого молока взвешивают в сухой стерильной бюксе или стаканчике и постепенно добавляют в него 9 мл стерильной воды при температуре 37–40°C, осторожно взбалтывают до растворения в течение 5–10 мин, получают одно разведение – 1:10. Из него, как указано выше, готовят два разведения – 1:100 и 1:1000. Посевы на МПА производят из второго и третьего разведений и ставят в термостат при температуре 37°C.

Для определения присутствия кишечной палочки 1 мл первого и второго разведений высевают в пробирку со средой Кесслера, термостатируют при температуре 43°C.

Если через 48 ч признаки брожения (газообразование) не появляются, продукт считают не загрязненным кишечной палочкой. В случае газообразования производят посев материала из всех забродивших пробирок в среду Эндо тонким штрихом (если брожение обнаружено в одной из пробирок с посевом 1 мл, на среду Эндо высевают 1 мл из всех пробирок с посевом). Посевы термостатируют 18–24 ч при температуре 37°C, затем из них готовят препараты с окраской по Граму. После микроскопирования с колоний бактерий, морфологически соответствующих кишечной палочке, производят посев петлей небольшого количества материала (три капли из бульонной культуры) в элективные среды Симонса и в среду с лактозой. Посевы термостатируют 24 ч при температуре 37°C. Отсутствие брожения в среде с лактозой характерно для бактерии пара-коли. Изменение цвета среды Симонса до светло-синего характерно для бактерии аэрогенес.

Учитывают все разновидности кишечной палочки, кроме бактерии аэрогенес (*Bacillus coli aerogenes*). Типичной кишечной палочкой считается та, которая морфологически ей соответствует, обладает подвижностью, хотя бы слабо выраженной, не окрашивается по Граму, вызывает брожение с образованием кислоты и газа на среде с лактозой.

Коли-титр молока и молочных продуктов устанавливают по специальным таблицам (таблицы 6 и 7).

Таблица 6. Расчет коли-титра для пастеризованного молока

Объем молока, в котором обнаружена кишечная палочка, мл						Коли-титр, мл
1	1	1	0,1	0,1	0,1	
–	–	–	–	–	–	Более 3,0
+	–	–	–	–	–	3,0
+	+	+	+	+	–	3,0
+	+	–	+	+	+	Менее 3,0
+	+	+	+	+	+	Менее 3,0
В остальных случаях						0,3

Таблица 7. Расчет коли-титра для сухого молока

Объем молока, в котором обнаружена кишечная палочка, мл					Коли-титр, мл
1	0,1	0,01	0,001	0,0001	
–	–	–	–	–	Более 1,1
+	+	+	+	+	Менее 0,0001

Объем молока, в котором обнаружена кишечная палочка, мл					Коли-титр, мл
1	0,1	0,01	0,001	0,0001	
+	–	–	–	–	1,0
+	+	–	–	–	0,1
+	+	–	–	–	0,01

Для других молочных продуктов при посеве стандартных разведений продукта руководствуются следующим:

- если ни в одной из пробирок не обнаружено газообразование, то продукт считают практически не загрязненным кишечной палочкой;
- если признаки брожения наблюдаются во всех пробирках, то коли-титр равен наименьшему объему или массе продукта, находящемуся в пробирке с наибольшим разведением;
- если брожение обнаружено только в одной пробирке, то коли-титр равен общему объему (или массе) продукта во всех пробирках;
- если брожение отмечается не во всех пробирках, то коли-титр равен общему объему или массе продукта во всех пробирках, деленному на количество пробирок с признаками брожения; при больших разведениях (более 1:100) за коли-титр принимают количество продукта в забродившей пробирке с наименьшим разведением.

### Задание 3. Микроскопический анализ кисломолочных продуктов

Различные кисломолочные продукты характеризуются свойственной им микрофлорой. Из продукта готовят окрашенные комбинированным фиксатором препараты (смесь одной части метилового спирта, одной части эфира, 0,2 части метиленового синего). При микроскопировании определяют морфологию и количественное соотношение молочнокислых микробов закваски. Регистрируют постороннюю микрофлору, которая определяет загрязненность продукта (дрожжи, бациллы, мицелий и т. п.).

Качество кисломолочных продуктов во многом зависит от правильности протекания кисломолочного брожения, что, в свою очередь, определяется чистотой применяемых заквасок. Поэтому одним из дополнительных методов исследования кисломолочных продуктов является микроскопия мазка, которая проводится с целью установления соответствия между микрофлорой продукта и закваски. Если такое соответствие обнаруживается, то продукт считается доброкачественным. В случае обнаружения присутствия посторонней микрофлоры (споровых палочек, пленчатых дрожжей, кусочков гифов, мицелия) делается вывод о недоброкачественности продукта.

*Микрофлора сметаны и обыкновенной простокваши* характеризуется молочнокислыми стрептококками *Streptococcus lactis*, может быть в форме диплококка *Streptococcus cremoris*, в виде цепочки кокков.

*Микрофлора лактобациллина* содержит культуры *Streptococcus lactis* и палочковидную *Bacillus bulgaricus* (неслизистую, слизистую расы). В препарате из качественного лактобациллина клеток *Streptococcus lactis* в 3–4 раза больше, чем клеток *Bacillus bulgaricus*.

*Микрофлора ацидофильных продуктов* – это культура ацидофильной палочки *Bacillus acidophilus*.

Ацидофильная палочка устойчива к фенолу, индолу, щелочам и отличается большой биохимической активностью. *Bacillus acidophilus* обитает в кишечнике человека и животных, где вырабатывает молочную кислоту, другие продукты обмена и специфические вещества, обладающие антибиотическим действием по отношению к некоторым вредным бактериям.

*Ацидофилин* готовят на культурах ацидофильной палочки и молочнокислого стрептококка. При микроскопировании препарата в поле зрения клеток стрептококка в 3–4 раза больше, чем палочек.

*Ацидофильное молоко* содержит только культуру ацидофильной палочки.

*Ацидофильно-дрожжевое молоко* готовят на культуре ацидофильной палочки и сбраживающих лактозу дрожжей. При микроскопировании препарата в поле зрения видны зернистые ацидофильные палочки и 5–6 клеток дрожжей.

*Микрофлора кефира и кумыса* – это продукты комбинированного брожения – молочнокислого и спиртового. Кефирные грибки являются естественным симбиозом молочной палочки (*Betabacterium caucasicum*), кефирных дрожжей и молочнокислых стрептококков (табл. 8). Палочки образуют строму (основу) кефирного грибка и называются палочкой стромы.

Мазки готовят из всех представленных для исследования продуктов (простокваши, кефира, сметаны, ацидофильного молока), фиксируют на пламени горелки, красят метиловым голубым в течение 5–6 мин и микроскопируют.

Таблица 8. Микрофлора кефира и кумыса

Препарат	Молочнокислый стрептококк	Молочнокислые палочки	Молочные дрожжи	Коли-титр, мл
Молодого кефира	Преобладает	Встречаются	Мало	Не установлен
Выдержанного кефира	50–70%	Встречаются	Значительно больше, чем в молодом кефире, но в пределах 10% всей микрофлоры	Не установлен
Кумыса	Может быть не обнаружен	Преобладают	В пределах 10% всей микрофлоры	Не ниже 0,3

Для приготовления препарата-отпечатка кефирного грибка раздавливают небольшой кусочек грибка между двумя предметными стеклами, разнимают их и убирают излишки материала.

Препарат фиксируют смесью спирта с эфиром в течение 5 мин, окрашивают метиленовым синим, промывают и просушивают. При микроскопировании в поле зрения видны массы переплетающихся палочек стромы, в петлях между ними – дрожжевые клетки и клетки молочнокислого стрептококка в виде коротких цепочек и двойных кокков. Кумыс содержит молочнокислые палочки типа болгарской или ацидофильной и сбраживающие лактозу дрожжи.

Сравнивая микрофлору мазка с микрофлорой закваски, делают вывод о доброкачественности продукта. По составу микрофлоры мазка дайте заключение от качества продуктов по форме табл. 9.

Таблица 9. Результаты исследования микрофлоры молочных продуктов

Название продукта	Микрофлора закваски	Фактическая микрофлора в мазке	Заключение о качестве
-------------------	---------------------	--------------------------------	-----------------------

#### Задание 4. Микробиологический анализ сыра

В основе сыроделия лежат сложные биохимические процессы, основная роль в которых принадлежит молочнокислому и пропионовокислому брожению. Большое влияние на качество готового продукта оказывает качество молока и, прежде всего, степень обсемененности его нежелательными микроорганизмами.

Свертывание молока (коагуляцию казеина) проводят, заквашивая его молочнокислыми бактериями и вводя сычужный фермент. Такие сыры называются *сычужными*. Сыры, в созревании которых участвуют только молочнокислые бактерии, называют *кисломолочными*.

По степени разложения казеина сычужные сыры делят на *твердые* и *мягкие*. Твердые сыры, в свою очередь, делят на *крупные* (швейцарский, советский) и *мелкие* (голландский, костромской и др.).

Крупные сыры имеют более длительный период созревания (6–9 мес.), чем мелкие (1–2 мес.), в процессе их приготовления участвуют преимущественно молочнокислые палочки *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticum*, в меньшей степени – молочнокислые лактококки *Lactococcus lactis* и ароматообразующие лактококки.

В закваску для крупных сыров наряду с молочнокислыми бактериями включают и пропионовокислые палочки. Стадия пропионовокислого брожения следует за стадией молочнокислого брожения и сопровождается накоплением летучих кислот – пропионовой, уксусной и диоксида углерода, образующихся при сбраживании лактатов. Выделение диоксида углерода обуславливает появление рисунка сыра – так называемых *глазков*. В мелких сырах глазки образуются в первые дни ферментации в процессе жизнедеятельности ароматообразующих лактококков.

Свойства сыра – вкус, аромат, консистенция, рисунок – формируются как результат сложных биохимических процессов, главная роль в которых принадлежит микроорганизмам, внесенным в сырную массу с закваской.

Наличие микроорганизмов в сыре может служить и причиной различных его пороков. Раннее вспучивание сыров вследствие образования большого количества газов ( $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2$ ) вызывают бактерии группы кишечной палочки в период, когда в сыре еще недоиспользована лактоза. Позднее вспучивание вызывают маслянокислые бактерии рода *Clostridium*, сбраживающие молочную кислоту в масляную с выделением  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2$ . Изъявление корки сыра могут вызывать плесневые грибы.

При полном анализе сыра проводят количественное определение микроорганизмов методом посева на агаре с гидролизованным молоком измельченной и растертой при подогреве до  $45^\circ\text{C}$  пробы сыра.

При изучении микрофлоры сыра можно также использовать метод отпечатков, дающий возможность охарактеризовать естественное расположение микроорганизмов в сыре. Для этого сначала у взятого для исследования свежего сыра ножом срезают то место, где будет взята проба. Затем срезают тонкий кусочек сыра, кладут его между двумя сухими чистыми предметными стеклами и сдавливают ими. Затем стекла осторожно разъединяют и сыр удаляют. Полученный на стекле отпечаток сушат вдали от пламени, фикси-



руют смесью спирта с эфиром (1:1) и окрашивают метиленовым синим. При микроскопировании крупных сыров выявляются палочковидные формы молочнокислых и пропионовокислых бактерий, при микроскопировании мелких сыров – молочнокислые лактококки.

### **Задание 5. Микробиологический анализ сливочного масла**

Различают два основных типа сливочного масла: сладко-сливочное и кисло-сливочное.

*Сладко-сливочное масло* готовят из пастеризованных сливок, которые не заквашиваются. По технологии приготовления масла этого типа присутствие микрофлоры нежелательно: чем меньше микроорганизмов, тем лучше масло. Снижения численности микрофлоры достигают пастеризацией сливок с последующей упаковкой и хранением масла при низких температурах ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), а также надлежащим уходом за оборудованием. Загрязнение масла возможно из-за недоброкачественной воды, используемой для его промывания. В 1 мл свежего сладкосливочного масла содержится 50 000–100 000 клеток бактерий.

Технология *кисло-сливочного масла* основана на использовании молочнокислых бактерий для сквашивания сливок. После пастеризации в сливки вносят закваску, состав микрофлоры которой важен для повышения *прочности* (устойчивости при хранении) и улучшения аромата масла. В состав закваски входят *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris* и ароматобразующие бактерии *Lactococcus diaceiilactis*, *Lactococcus atrovorus* и *Lactococcus paracitrovorus*. В 1 мл кисло-сливочного масла содержится от 1 до 10 млн бактерий.

Масло для учета численности микроорганизмов берут стерильным шупом из 2–3 мест по 10–15 г и помещают в стерильные банки с притертыми пробками. При исследовании на плесневые грибы делают соскобы с поверхности масла, особенно с тех мест, где простым глазом или в лупу виден мицелий гриба.

Перед исследованием пробу масла расплавляют в банке на водяной бане, нагретой до температуры  $40\text{--}50^{\circ}\text{C}$ . Из расплавленного масла после тщательного перемешивания стерильной пипеткой берут 1 мл и вносят в пробирку с 9 мл стерильной воды, подогретой до температуры  $40^{\circ}\text{C}$ . Из полученного таким образом разведения 1:10 готовят все последующие разведения (1:100; 1:1 000; 1:10 000; 1:100 000). Из соответствующих разведений делают посев на элективные среды: для учета общего количества бактерий – на агар с гидролизированным молоком или МПА, для учета протеолитических бактерий – на молочный агар, молочнокислых бактерий – на агар с гидролизированным обратом и мелом, дрожжей – на сусло-агар со стрептомицином, для определения бродильного титра – на среду Кесслера.

Для микроскопического исследования берут кисло-сливочное свежее и несвежее масло. Его плавят в стеклянном стакане на водяной бане при температуре  $40^{\circ}\text{C}$ , перемешивают, наливают в центрифужную пробирку и центрифугируют 10 мин. Верхний слой сливают, из осадка готовят препарат. Мазок прогревают на пламени горелки и обезжиривают, прикладывая к неостывшему мазку фильтровальную бумагу, окрашивают метиленовым синим в течение 2–3 мин.

В свежем кисло-сливочном масле присутствуют молочнокислые лактококки, в несвежем масле наряду с молочнокислыми бактериями встречаются дрожжи, плесневые грибы и гнилостные бактерии.

### **Контрольные вопросы**

1. Каковы культуральные свойства разновидностей кишечной палочки при росте их на среде Эндо?
2. Как должны внешне измениться среда с лактозой и среда Симонса при росте различных видов кишечной палочки?
3. Характеристика типичной кишечной палочки по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам.
4. По каким микробиологическим показателям определяют качество кисломолочных продуктов?
5. Характеристика микрофлоры заквасок для сметаны, ацидофильных продуктов, кефира.
6. Для изготовления каких продуктов используют закваски с термофильными молочнокислыми бактериями и стрептококками?
7. Почему в кисломолочных продуктах не определяют микробное число?
8. Как можно определить качество кисломолочных продуктов микроскопическим методом?
9. Характеристика микрофлоры сыра и сливочного масла.

### **Работа 7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЧЕСТВА МЯСА, МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ, РЫБЫ И РЫБНЫХ ПРОДУКТОВ ПО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ**

**Цель работы:** определить доброкачественность мяса, мясных продуктов, рыбы и рыбных продуктов бактериологическим методом.

### **Материальное обеспечение**

1. Микроскопы.
2. Бактериальные петли.
3. Предметные стекла.

4. Реактивы для окрашивания по Граму.
5. Мясо говядины или свинины.
6. Рыба.

**Гниение** – процесс глубокого распада белков, вызываемый группой гнилостных бактерий. Эти бактерии преимущественно используют белки и продукты их расчленения. При распаде аминокислот выделяется азотистая группа и углеродный скелет аминокислот. Потребность клетки в азотистой группе меньше, чем в углеводе, и в среде накапливается аммиак. Поэтому для гнилостного процесса характерны щелочная реакция среды и запах аммиака.

В гнилостном процессе принимают участие аэробы и анаэробы. Наиболее активны *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus* и др.

Гниение начинается обычно с поверхности и затем проникает вглубь мяса. В аэробных условиях и температуре 10°C гниение начинают шаровидные бактерии (стрептококки, сарцины и т. п.), палочковидные формы (протей, кишечная палочка и др.). Через 3–4 дня в глубине мышц начинают размножаться анаэробы, а спустя 7–8 дней развиваются строгие анаэробы. Чем меньше обсемененность продукта микроорганизмами и ниже температура хранения, тем длительнее сохраняется продукт.

По доброкачественности или свежести мясо делят на три категории. Мясо I категории – свежее, II – сомнительной свежести и III категории – несвежее. Свежим считается мясо, в котором количество анаэробных микроорганизмов, содержащихся на 1 см<sup>2</sup> поверхности, не превышает 10–100 тыс. Спорообразующих аэробов в 1 г продукта может быть не более 10–100 клеток. Содержание в 1 г мяса спорообразующих аэробов, выдерживающих нагрев, должно быть менее 1 споры. Общее количество аэробных бактерий в 1 г сырого мяса и сырых мясопродуктов (без добавления веществ, задерживающих рост микроорганизмов) не должно превышать 100 тыс., бактерий кишечной палочки – не более 100 в 1 г. Содержание патогенных бактерий не допускается.

При анализе производят микроскопическое исследование мяса и количественный учет микрофлоры, по мере надобности определяют основные группы микробов.

### Задание 1. Микроскопическое исследование мяса

Производя микробиологический анализ мяса, необходимо учитывать возможность его заражения случайной поверхностной микрофлорой. Перед анализом эту микрофлору уничтожают. Пробу мяса погружают на несколько секунд в спирт, затем вынимают, двукратно обжигают пламенем горелки. Из середины пробы стерильными ножницами вырезают кусок мяса с возможно большей поверхностью.

Препараты-отпечатки берут с поверхности образца мяса и из его глубинных частей (от двух до десяти отпечатков). При микроскопировании тушек птицы асептически вырезают небольшие кусочки тазобедренных мышц и готовят по три препарата-отпечатка из каждой тушки на двух предметных стеклах.

Если препарат берут из глубины образца, поверхность мяса прижигают раскаленным ножом и делают стерильным ланцетом вертикальный разрез. Пинцетом раздвигают края разреза, из глубины образца вырезают кусочек мышц. Срезанными сторонами кусочек мышц прикладывают к предметному стеклу (для препарата-отпечатка) или размазывают его по стеклу, излишек материала удаляют. Для препарата-отпечатка поверхности образца предварительное обжигание исключают.

Отпечатки высушивают на воздухе и фиксируют 96%-ным спиртом 15–18 мин, парами 40%-ного формалина 5 мин, а также над пламенем спиртовки до горячего состояния предметного стекла.

Препараты окрашивают по Граму 2%-ным раствором метиленового синего, или 1–2%-ным водным раствором сафранина. Большинство гнилостных бактерий и кишечно-тифозная группа окрашиваются по Граму отрицательно. При выполнении лабораторной работы ограничиваются окраской препаратов по Граму.

Результаты анализа сравнивают с данными табл. 10 и делают выводы.

Таблица 10. Оценка свежести мяса микроскопическим методом

Степень свежести мяса	pH	Характеристика отпечатков
Свежее	5,9–5,5	Микрофлора не обнаруживается или видны единичные экземпляры кокков, дрожжей, палочек в поле зрения препарата. Отсутствуют остатки разложившейся ткани мяса. Окраска микрофлоры грамположительная
Сомнительной свежести	6,6	На отпечатках обнаруживается 20–30 кокков или несколько палочек в поле зрения микроскопа. Ясно видны следы распада мышечной ткани. Окраска микрофлоры грамположительная или грамотрицательная
Несвежее	6,7	В поле зрения много микроорганизмов, преобладают грамотрицательные палочки (почти все поле зрения усеяно ими). Много распавшейся ткани мышц

## Задание 2. Количественный и групповой анализ микрофлоры мяса

В процессе анализа определяют количество микробов в мясе, присутствие кишечного-тифозной группы, протей и анаэробов. В учебной работе можно ограничиться количественным определением микрофлоры. Стерильными ножницами вырезают из глубины разных мест обработанного образца кусочки не менее 2–3 см и засевают их путем размазывания по поверхности мясопептонного агара в чашках. Посевами в чашки на среду Эндо выявляется кишечная группа (после термостатирования – типичные колонии); в конденсационную воду свежескошенного мясопептонного агара обнаружится протей (голубоватый вуалеобразный налет культуры); в сахарный печеночный бульон – анаэробы (после термостатирования в течение 8–10 суток наблюдается значительное помутнение и газообразование среды).

Посевы в жидких средах перед термостатированием прогревают 20 мин при температуре 80°C для учета споровых форм. Часть пробирок оставляют непрогретыми. Все пробирки помещают в термостат на 24–48 ч, посевы анаэробов – на 10 суток при температуре 37°C.

Если в средах обнаружен рост микрофлоры, производят микроскопическое исследование. Колонии рассматривают с помощью лупы или при малом увеличении микроскопа.

При определении общего числа сапрофитной микрофлоры интенсивность роста обозначают следующими знаками:

- «–» – рост в чашке отсутствует;
- «+» – имеется от 20 колоний;
- «++» – имеется от 20 до 50 колоний;
- «+++» – имеется свыше 50 колоний.

На элективных средах количество колоний определяют указанным выше методом (в лабораториях), обозначая крестами: кишечную группу – красными, паратифозную – желтыми, остальные группы бактерий – черными.

## Задание 3. Микробиологическое исследование вареных колбас

Микрофлора колбас зависит в основном от микрофлоры мяса и другого сырья. В фарш могут попасть микроорганизмы из воздуха, оборудования, рук рабочих и т. п. Количественный и качественный состав микрофлоры зависит также от вида и сорта колбасы. Больше микроорганизмов содержится в ливерных колбасах, меньше в копченых. В вареных колбасах, подвергнутых действию высоких температур (68–70°C внутри батона), погибают беспоровые бактерии, но остаются невредимыми споры и частично кокковые формы и единичные палочки.

На практике бактериологические показатели вареных колбас постоянно определяются в тех случаях, когда партия колбас бракуется по органолептическим показателям и для производства колбас было использовано сомнительное по качеству мясо и субпродукты. Нарушение технологии производства и санитарного режима при производстве и хранении колбас может привести к обсеменению их кишечной палочкой и другими неспоровыми бактериями, что недопустимо. В колбасных изделиях могут присутствовать только *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus*. Согласно исследованиям различных авторов, в 1 г вареных колбас допускается не более 1–2 тыс. микроорганизмов. В зависимости от общего количества микроорганизмов в 1 г вареные колбасы подразделяются следующим образом: отличного качества – до 100 микроорганизмов, хорошего – до 1 000, удовлетворительного – до 3 000, плохого качества – до 5 000 микроорганизмов. Колбаса выпуску не подлежит при содержании свыше 5 000 микроорганизмов. Кишечная палочка в 1 г колбасы должна отсутствовать.

Отбор средней пробы проводят стерильно. Для колбасных изделий отбирают не менее двух проб массой 200–250 г каждая. Перед взятием навески поверхность батониров протирают ватным тампоном, смоченным спиртом, затем – горящим тампоном. После такой обработки скальпелем, предварительно прокаленным над пламенем горелки, разрезают батон вдоль, не затрагивая противоположной стороны и с поверхности обеих половин соскабливают или вырезают фарш.

Для определения общего микробного обсеменения в бюксе отвешивают 5 г колбасы, переносят в ступку и растирают с небольшим количеством песка, постепенно добавляя 45 мл воды. Разведение готовится с соблюдением стерильности. Из первого разведения 1:10 готовят второе – 1:100 и третье – 1:1 000, как указано выше. Для посевов на МПА используют 1 мл второго и третьего разведений, помещают в термостат при температуре 37°C.

Для установления присутствия кишечной палочки из батона вырезают 2–3 небольших кусочка колбасы массой 1 г и помещают в две пробирки, на  $\frac{1}{2}$  заполненные средой Кесслера, термостатируют при температуре 43°C.

#### Задание 4. Микробиологическое исследование рыбы

Состав микрофлоры рыбы разнообразен. На поверхности рыбы, покрытой слизью (сленом), часто обнаруживаются микрококки, сарцины, спорогенные и аспорогенные палочки, представители кишечной группы. В кишечнике рыбы развиваются гнилостные бактерии.

При микроскопировании для определения качества рыбы препарат-отпечаток берут из глубины мышц. Кожу посередине спины рыбы освобождают от чешуи и прижигают раскаленным ножом.

Стерильным скальпелем делают разрез, пинцетом расширяют его и на глубине 1–1,5 см вырезают кусочек мышц площадью около 2 см<sup>2</sup>. Приготавливают препарат-отпечаток, его подсушивают, фиксируют над пламенем спиртовки и окрашивают по Граму или метиленовым синим.

При другом способе микробиологического исследования рыбы на глубину 1,5–2 см разреза тушки помещают стерильное предметное стекло, а разрез зажимают стерильным пинцетом. Затем стекло извлекают, одну сторону обтирают ватой, смоченной спиртом, другую – фиксируют, окрашивают и просматривают под микроскопом. Отмечают форму микробов и их количество (отсутствуют, единичные в препарате, единичные в поле зрения, множество в поле зрения).

Препарат-отпечаток с поверхности рыбы делают без предварительного ее прижигания. Отпечаток с поверхностных слоев рыбы часто содержит округлые темные пятна пигмента; не следует смешивать их с кокками.

Результаты оценки сравнивают с данными табл. 11.

Таблица 11. Оценка качества свежей и мороженой рыбы микробиологическим методом

Характер исследования	Рыба		
	свежая	небольшой давности улова, допустимая к употреблению	испорченная, непригодная к употреблению
Микроскопия поверхности	Единичные микробы в мазке или поле зрения	Единичные микробы (5–6) в поле зрения	40 и более клеток в поле зрения
Характер исследования	Свежая	Небольшой давности улова, допустимая к употреблению	Испорченная, непригодная к употреблению
Микроскопия глубины мышц	Микробы не обнаружены	Единичные в препарате	От 10 до 20 и более клеток в поле зрения
Посев на чашке с питательным агаром: Обсемененность микробами при температурном оптимуме 20°C	От единичных колоний до рассеянного роста	От рассеянного роста колоний до обильного	От сплошного роста колоний до обильного
Обсемененность при температурном оптимуме 37°C	Рост отсутствует или видны единичные колонии	От единичных колоний до слабо рассеянного роста	От единичных колоний до сплошного роста
Реакция на лакмус (рН)	Слабокислая (6,8–6,4)	Кислая (6,4–6,0)	Кислая (6,5) или слабощелочная более (7,0); может быть в пределах нормы

#### Работа в лаборатории

1. Приготовьте мазки-отпечатки из поверхностных и глубинных слоев двух проб рыбы (работа предназначена для группы из четырех человек).

2. Определите количественный и качественный состав микрофлоры под микроскопом, сравните с нормативами и сделайте вывод о свежести анализируемого образца, сравните его с результатами и выводами других исследователей.

3. Результат оформите в виде табл. 12.

Таблица 12. Результаты микробиологического исследования рыбы

Номер образца	Место взятия мазков-отпечатков	Среднее количество бактерий в поле зрения		Морфологическая характеристика обнаруженной микрофлоры
		кокков	палочек	

#### Контрольные вопросы

1. Какие внешние изменения происходят в среде Кесслера при росте кишечной палочки?
2. Качественная характеристика микрофлоры мяса.
3. Каковы пути обсеменения мясных туш микроорганизмами?

4. По каким показателям определяется свежесть мяса?
5. Как правильно отобрать пробу для бактериоскопии мяса и провести исследование?
6. Характеристика микрофлоры свежего мяса и мясных продуктов.
7. Как приготовить мазок-отпечаток для определения свежести мяса?
8. Цель бактериоскопического исследования мяса.
9. Качественная характеристика микрофлоры рыбы.
10. По каким показателям определяется свежесть рыбы?
11. Как правильно отобрать пробу для бактериоскопии рыбы и провести исследование?
12. Характеристика микрофлоры свежей рыбы.
13. Как приготовить мазок-отпечаток для определения свежести рыбы?
14. Цель бактериоскопического исследования мяса рыбы.

## **Работа 8. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МУКИ И ХЛЕБОБУЛОЧНЫХ ИЗДЕЛИЙ**

**Цель работы:** изучить представителей микрофлоры муки и хлебобулочных изделий; освоить методы санитарно-микробиологического контроля качества муки и хлебобулочных изделий.

### *Материальное обеспечение*

1. Образцы муки, дрожжи.
2. Ватные тампоны.
3. Стекланные палочки.
4. Стерильные чашки Петри.
5. Пробирки со средой Кесслера.
6. МПА с температурой 43–45°C.

Микрофлора муки зависит от микроорганизмов поверхности зерна и попавших в муку с внешней среды при помоле и хранении. Это могут быть спорообразующие *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus*, непорывые *Pseudomonas heribcola*, споры различных плесневых грибов, в том числе головни и спорыньи.

В доброкачественной муке количество бактерий обычно не превышает 2–3 млн на 1 г. Увеличение числа бактерий свидетельствует о возможной порче продукта, а резкое уменьшение – о длительности хранения. Показателем свежести продукта является преобладание в составе микрофлоры *Pseudomonas heribcola*, количество которой не снижается ниже 90% от общего количества микроорганизмов. В свежей муке практически отсутствуют кокки и количество спорных бактерий не превышает 1 тыс. на 1 г.

Из спорных бактерий особое значение для оценки качества муки имеет картофельная палочка. Споры ее отличаются устойчивостью к повышению температуры и сохраняют жизнеспособность при выпечке хлеба, а затем, развиваясь на хлебе, вызывают «картофельную» болезнь, и продукт становится непригодным к употреблению.

В практике хлебопечения приняты следующие нормы содержания картофельной палочки в 1 г муки:

- до 200 спор – мука нормального качества;
- от 200 до 1 000 спор – сомнительного качества;
- свыше 1 000 спор – непригодная для непосредственного употребления.

Спор плесневых грибов в муке мало, от 0,5 до 3 тыс. на 1 г продукта, преобладают грибы из рода *Penicillium*. Резкое увеличение аспергилловых грибов свидетельствует о нагревании муки или о длительном ее хранении.

Кишечная палочка должна присутствовать в муке в малом количестве, титр ее колеблется в пределах от 0,01 до 0,001.

### **Задание 1. Определение общей обсемененности муки**

Для определения общей микробной обсемененности 5 г муки взбалтывают в колбе с 45 мл стерильной воды в течение 5 мин и получают первое разведение 1:10, из которого затем получают второе, третье и четвертое разведения.

Для определения количества бактерий 1 мл третьего и четвертого разведений заливают в чашке Петри мясопептонным агаром, а для обнаружения спор плесневых грибов производят посев 1 мл второго разведения на сусло-агар.

Для определения титра шишечной палочки 1 мл каждого разведения высевают в среду Кесслера и термостатируют при температуре 43°C.

Оставшиеся после посевов взвеси первого и второго разведений нагревают на водяной бане при темпе-

ратуре 80°C в течение 10 мин, охлаждают и 1 мл пастеризованной взвеси заливают в чашки Петри. Затем туда добавляют смесь мясопептонного агара и сусло-агара в соотношении 1:1.

Для разрыхления теста применяют прессованные, сухие и жидкие дрожжи. Выпускаемые промышленностью прессованные дрожжи представляют собой живые дрожжевые клетки, отделенные от питательной среды.

Технологические показатели дрожжей определяются главным образом функциональной активностью клеток и степенью чистоты культуры. При микробиологическом анализе дрожжей на разных стадиях их получения и в готовом продукте функциональная активность исследуется микроскопически (по общему числу клеток в 1 мл), по возрастным морфологическим особенностям клеток (по числу почкующихся и мертвых особей), а также по ряду биохимических тестов (например по подъемной силе дрожжей, которая зависит от интенсивности выделения клетками CO<sub>2</sub>).

Примеси посторонних микроорганизмов, снижающих качество дрожжей (дрожжи рода *Candida*, *Torulopsis* и др., мицелиальные грибы, спорообразующие бактерии – сенная, картофельная палочки и др.), определяют методами прямой микроскопии и посевом на питательные среды. Показателем степени чистоты дрожжей является также подъемная сила дрожжей.

## **Задание 2. Определения подъемной силы дрожжей (по методу Островского)**

Навеску прессованных дрожжей массой 2–3 г помещают в мерный цилиндр объемом 100 мл, наливают немного воды и размешивают дрожжи стеклянной палочкой. В пробирку доливают воду комнатной температуры до объема 100 мл и размешивают содержимое. Пипеткой отбирают 5 мл суспензии, переносят в чашку Петри, добавляют 8 г пшеничной муки, замешивают шпателем шарик теста и помещают его в стакан с 200 мл воды (при температуре 30°C). Отмечают продолжительность времени от момента погружения шарика до всплытия, которая характеризует подъемную силу дрожжей. Дрожжи должны иметь подъемную силу от 10 до 20 мин.

### ***Работа в лаборатории***

1. Сделайте посев муки на среду Кесслера.
2. Пробы подпишите и термостатируйте при температуре 43°C (1 пробирка с тампоном и водой и 1 пробирка со средой Кесслера на каждого студента).
3. Определите подъемную силу дрожжей и оформите полученные результаты в лабораторном журнале.

### ***Контрольные вопросы***

1. Каковы пути обсеменения муки и хлебобулочных изделий микроорганизмами?
2. Характеристика микрофлоры муки и хлебобулочных изделий.
3. Цель бактериоскопического исследования муки и хлебобулочных изделий.
4. Цель определения подъемной силы дрожжей.

## **Работа 9. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НА ПРЕДПРИЯТИЯХ ОБЩЕСТВЕННОГО ПИТАНИЯ И В ОРГАНИЗАЦИЯХ ТОРГОВЛИ**

**Цель работы:** изучить представителей кишечного-тифозной группы бактерий и их свойства, группы кишечной палочки и их санитарное значение, освоить методы санитарно-микробиологического контроля, проводимого в организациях торговли и на предприятиях общественного питания.

### ***Материальное обеспечение***

1. Ватные тампоны.
2. Стеклянные палочки.
3. Стерильные чашки Петри.
4. Пробирки со стерильной водой (10 мл).
5. МПА с температурой 43–45°C.

Одним из требований, предъявляемых к качеству пищевых продуктов, является их безвредность для организма человека. Под этим следует понимать не только отсутствие в продукте вредных для организма человека веществ, но и патогенных микроорганизмов. Последние могут попасть в продукт из воздуха, с водой, с оборудования, рук и одежды персонала и т. д. Поэтому на всем продвижении товара от сырья до готового продукта и далее до потребителя необходимо оградить продукт от попадания в него микроорганизмов, в том числе болезнетворных.

Патогенные микроорганизмы во внешней среде встречаются непостоянно, сохраняют жизненную способность ограниченное время и по количеству значительно уступают непатогенным. Выделение и идентификация патогенных микроорганизмов связана с большими трудностями. Поэтому более удобно определить их косвенным путем по присутствию во внешней среде санитарно-показательных микроорганизмов.

Санитарно-показательными считаются микроорганизмы, постоянно обитающие в отдельных полостях тела человека и животных и выделяемые ими во внешнюю среду, т. е. это своеобразные индикаторы, по которым судят о загрязнении внешней среды человеком и животными. Сами по себе микроорганизмы во внешней среде не обитают.

Для возбудителей кишечной инфекции роль индикаторов могут выполнять сапрофитные обитатели содержимого кишечника: кишечная палочка и ее разновидности, энтерококки и спорообразующие анаэробы. Эти микроорганизмы обнаруживаются везде, где живет человек (в почве, воде, кишечнике домашнего скота, птиц и т. д.), и свидетельствуют об имевшем место фекальном загрязнении среды человеком. Из всех перечисленных микроорганизмов за санитарный показатель принята кишечная палочка, так как сроки ее сохранения в неизменном виде во внешней среде совпадают со сроками выживания патогенных микроорганизмов. Удобным оказалось и то, что методы обнаружения кишечной палочки довольно быстрые и простые.

Таким образом, первым показателем санитарного состояния предприятий общественного питания и организаций торговли является присутствие санитарно-показательных микроорганизмов – кишечной палочки.

Кроме кишечной палочки, для некоторых пищевых продуктов как санитарно-показательный может быть использован протей; для воздуха – условно-патогенные микроорганизмы полости рта и носоглотки (зеленящий и гемолитический стрептококки, гемолитический стафилококк).

Вторым показателем служит общее бактериальное загрязнение оборудования и инвентаря – микробное число, т. е. количество микроорганизмов, приходящихся на 1 см<sup>2</sup> исследуемой площади.

### Характеристика группы кишечной палочки

В природе встречается несколько разновидностей кишечной палочки. Попадая во внешнюю среду со свежими фекальными загрязнениями, кишечная палочка *Escherichia coli commune* приспосабливается к среде обитания и через несколько месяцев превращается в разновидность *Escherichia coli citrovorum*. Дальнейшее пребывание кишечной палочки во внешней среде приводит к появлению новой разновидности *Escherichia coli aerogenes*. И, наконец, под действием болезнетворных микроорганизмов в кишечнике больного человека *Escherichia coli commune* видоизменяется в *Escherichia paracoli*. Таким образом, все разновидности кишечной палочки имеют санитарно-показательное значение. Разница лишь в том, что *Escherichia coli commune*, *Escherichia paracoli* свидетельствуют о свежем, а во втором случае и опасном фекальном загрязнении, а другие виды – о старом загрязнении.

Отдельные разновидности кишечной палочки различаются между собой по характеру роста на дифференциально-диагностической среде Эндо и ряду биохимических свойств (табл. 13).

Таблица 13. Морфологические и биохимические особенности представителей кишечнотифозной группы

Виды кишечной палочки	Рост на средах		
	Эндо	с добавлением лимонной кислоты	с лактозой
1. <i>Escherichia coli commune</i>	Колонии темно-красные с металлическим блеском	–	+
2. <i>Escherichia coli citrovorum</i>	Колонии красные и розовые	–	+
3. <i>Escherichia coli aerogenes</i>	Колонии красные и розовые	+	+
4. <i>Escherichia paracoli</i>	Колонии прозрачные, бесцветные	–	–

Некоторые из этих свойств используют для идентификации вида кишечной палочки, обнаруженной в пищевых продуктах и внешней среде.

### Задание 1. Определение количества микроорганизмов в воздухе

Для посева воздуха методом оседания по Коху, основанным на оседании микроорганизмов на поверхность питательной среды, чашки Петри с МПА размещают в разных местах помещения, снимают крышки и оставляют их открытыми на 10–20 мин. Вместе с пылью и капельками влаги на поверхность агара оседают и микроорганизмы. По истечении установленного времени чашки закрывают, подписывают на крышках и помещают в термостат при температуре 37°C на 48 часов; далее производят подсчет колоний,

выросших на чашках Петри, и делают пересчет на 1 м<sup>3</sup> воздуха по правилу Омелянского, согласно которому на площадь 100 см<sup>2</sup> в течение 5 мин оседает столько микроорганизмов, сколько их находится в 10 л воздуха

(1 м<sup>3</sup> равен 1 000 л). Количество микроорганизмов в 1 м<sup>3</sup> воздуха рассчитывается по формуле

$$X = \frac{N \cdot 100 \cdot 1000}{S \cdot 10 \cdot a},$$

где  $X$  – количество микроорганизмов в 1 м<sup>3</sup> воздуха;

$N$  – количество колоний в чашке Петри;

$S$  – площадь чашки Петри;

$a$  – поправка на время посева (при посевах 10 мин  $a = 2$ ).

Согласно нормативам воздух жилых помещений считают чистым при содержании в 1 м<sup>3</sup> его до 1 500 бактерий и 16 стрептококков, загрязненным – при содержании 2 400 всех бактерий и 36 стрептококков. Подсчитать количество бактерий на чашках можно несколькими способами:

- при небольшом количестве колоний их просто считают, иногда пользуясь лупой;
- при среднем количестве колоний чашку делят на секторы, считают колонии в каждом из них и суммируют;
- при большом количестве колоний подсчет ведут с помощью счетной камеры Вольфюгеля – это стеклянная пластинка, разделенная на 144 квадрата, каждый площадью 1 см<sup>2</sup>; квадраты, расположенные по диагонали, в свою очередь, разделены на 9 маленьких квадратов.

Открытую чашку дном вверх помещают под стекло камеры и подсчитывают число колоний в нескольких (не менее 10) квадратах, расположенных в разных местах чашки. Затем делают пересчет их во всей чашке. Для этого площадь чашки вычисляют по формуле  $\pi r^2$ , где  $\pi = 3,14$ , а радиус ( $r$ ) определяют с помощью линейки. Среднее содержание колоний на площади 1 см<sup>2</sup> чашки вычисляют как среднее арифметическое из десяти определений. Умножив эти два числа, получают цифру, указывающую на количество всех колоний, выросших на чашке.

## **Задание 2. Определение количества микроорганизмов в воде**

Исследуемую воду в объеме 1 мл выливают в стерильную бактериологическую чашку и заливают расплавленным и остуженным до 40–45°C агаром. При этом агар хорошо перемешивают с водой. Засеянную чашку оставляют на ровной поверхности стола до застывания, чашки подписывают, переворачивают вверх дном и помещают в термостат при температуре 37°C на 24 ч.

Подсчет колоний в посевах воды производится так же, как и в посевах воздуха, однако расчет ведется на 1 мл. Число выросших колоний в чашке будет показывать количество микроорганизмов в 1 мл воды. Согласно требованиям ГОСТ 2874-73, вода питьевая считается чистой, если в 1 мл содержится не более 100 микроорганизмов.

### ***Работа в лаборатории***

1. Сделайте посев воздуха в разных местах производственных помещений (4 чашки на 1 подгруппу).
2. Сделайте посев воды (1 чашка на 1 студента).

## **Задание 3. Обнаружение кишечной палочки в смывах с рук и одежды персонала, торгового инвентаря**

Согласно «Методике санитарно-бактериологического контроля на предприятиях общественного питания и торговли пищевыми продуктами» смывы для обнаружения кишечной палочки берут с рук персонала и различных объектов внешней среды. Для этой цели удобно применять тампоны из ваты на стеклянной (деревянной) палочке. В верхней части палочки находится второй тампон, заменяющий пробку в пробирке со стерильной водой. Тампон, предназначенный для смыва, должен находиться над уровнем жидкости.

Для взятия пробы палочку, слегка вращая, проталкивают, придерживая пробирку, до полного смачивания тампона. Вынимают последний вместе с пробиркой, производят смыв и снова погружают тампон в жидкость, готовя взвесь микроорганизмов в воде.

При взятии смывов с рук тщательно протирают влажным тампоном ладони обеих рук, проводя не менее 5 раз по каждой ладони и пальцам. Особенно внимательно делают смыв между пальцами, под ногтями и около них.

Смыв с крупных объектов берут с площади 100 см<sup>2</sup>, используя при этом стерильные металлические трафареты площадью 25 см<sup>2</sup>.

При взятии смывов с санитарной одежды протирают 2 площадки по 25 см<sup>2</sup> на нижних частях каждого рукава и 2 площадки на передней части одежды. С полотенца берут 4 смыва (25 см<sup>2</sup> каждый). Смыв с мел-



кого инвентаря делают со всей поверхности: у мелких тарелок – с внутренней поверхности, у столовых приборов – с рабочей части и низа ручки. Смывы производят одним тампоном с трех одноименных мелких предметов.

Тампоны вместе со смывными водами, сохраняя стерильность, переносят в пробирки со средой Кесслера (приложение), подписывают и помещают в термостат при температуре 43°C.

Кишечная палочка, сбраживая лактозу, способствует помутнению среды Кесслера и накоплению в ватном тампоне пузырьков газа. Подобная реакция считается положительной, и с забродившей пробы делается пересев петлей методом последовательной штриховки на чашку со средой Эндо для установления вида кишечной палочки. Термостатирование проводят при температуре 37°C.

В случае отрицательной бродильной пробы исследование на этом этапе заканчивается, т. е. пересев в среду Эндо не делают.

#### **Задание 4. Определение микробного числа в смывах со столов, разделочных досок и других объектов**

Для взятия смыва с целью определения микробного числа необходимы ватный тампон на стеклянной (деревянной) палочке в сухой стерильной пробирке и пробирка с 10 мл стерильной воды, трафарет (шаблон) площадью 25 или 100 см<sup>2</sup>, предварительно прокаленный над горелкой или горящим тампоном. Тампон из сухой пробирки переносят в стерильную воду, делают смыв со 100 см<sup>2</sup> выбранной площади по трафаретам, тщательно готовят взвесь, стараясь максимально перенести микроорганизмы с тампона в воду. Взвесь объемом 1 мл помещают в стерильную чашку Петри и заливают расплавленным и остуженным до температуры 43–45°C мясопептонным агаром. На чашках делают соответствующие надписи и термостатируют их при температуре 37°C. В дальнейшем производят подсчет выросших колоний и делают пересчет на 1 см<sup>2</sup> площади смыва с учетом площади чашки Петри и общего объема взвеси (10 мл) по формуле

$$X = \frac{a \cdot 10}{S},$$

где  $X$  – количество микроорганизмов на 1 см<sup>2</sup> площади смыва;

$a$  – число колоний, выросших на чашке из 1 мл смыва;

10 – количество смывной воды;

$S$  – площадь смыва.

Санитарное состояние поверхности оценивают согласно нормам, приведенным в табл. 14.

*Таблица 14. Содержание микроорганизмов, характеризующих состояние поверхности объектов*

Количество микроорганизмов на 1 см <sup>2</sup>	Оценка
От 0 до 100	Хорошая
Более 100	Удовлетворительная
Более 1 000	Неудовлетворительная
Более 10 000	Плохая

#### **Работа в лаборатории**

1. Сделайте смыв с рук обслуживающего персонала, посуды, разделочных досок (при необходимости пользуйтесь шаблоном), приготовьте взвесь в воде и сделайте посев на среду Кесслера.

2. Пробы подпишите и термостатируйте при температуре 43°C (1 пробирка с тампоном и водой и 1 пробирка со средой Кесслера на каждого студента).

3. Сделайте смыв со столов и разделочных досок для определения микробного числа, приготовьте взвесь.

4. Сделайте посев 1 мл взвеси на МПА, чашку подпишите, термостатируйте при температуре 37°C (2 пробирки и 1 трафарет на 2 студентов).

*Примечание.* Отбор проб по заданиям 3 и 4 проводится в буфетах и столовой университета или в торговом зале продовольственного магазина.

#### **Контрольные вопросы**

1. Какие микроорганизмы входят в состав кишечного-тифозной группы бактерий?
2. Общие отличительные свойства микроорганизмов кишечного-тифозной группы.
3. Какой микроорганизм из кишечного-тифозной группы обладает наибольшей ферментативной активностью?

4. По каким микробиологическим показателям определяют санитарное состояние предприятия общественного питания и организации торговли?
5. Почему основным санитарно-показательным микроорганизмом считают кишечную палочку?
6. Как различаются между собой по свойствам разновидности кишечной палочки?
7. Какие существуют методы количественного определения микроорганизмов?
8. В чем заключается сущность определения микроорганизмов методом культивирования?
9. Все ли микроорганизмы, находящиеся в субстрате, можно определить методом культивирования?
10. В чем заключается сущность метода предельных разведений? Каково его отличие от чашечного метода?
11. Что такое коли-титр воды и для какой цели его определяют?
12. Для какой цели производится микробиологическое исследование смывов с рук?
13. Каковы задачи микробиологического исследования оборудования, инвентаря, спецодежды?
14. Каковы пути заражения пищевых продуктов, предметов обихода, инвентаря?
15. Могут ли микроорганизмы длительно сохраняться на оборудовании и инвентаре и при каких условиях?
16. Как проводят обследование рук персонала?
17. Как определяют микробное число?

### **СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

- Азаров, В. Н.** Основы микробиологии и пищевой гигиены / В. Н. Азаров. – М. : Экономика, 1981. – 216 с.
- Воробьева, Е. В.** Санитария и гигиена в торговле / Е. В. Воробьева. – М. : Экономика, 1982. – 64 с.
- Королева, Н. С.** Основы микробиологии и гигиены молока и молочных продуктов / Н. С. Королева. – М. : Легкая и пищевая пром-ть, 1984. – 168 с.
- Лерина, И. В.** Лабораторные работы по микробиологии / И. В. Лерина, А. И. Педенко. – М. : Экономика, 1986. – 128 с.
- Микробиология** и санитария / И. Ю. Ухарцева [и др.]. – Минск : ИВЦ Минфина, 2006. – 332 с.
- Микулович, Л. С.** Товароведение продовольственных товаров с основами микробиологии, санитарии и гигиены / Л. С. Микулович. – Минск : Выш. шк., 2002. – 429 с.
- Мишустин, Е. Н.** Микробиология / Е. Н. Мишустин, В. Т. Емцев. – М. : Агропромиздат, 1987. – 371 с.
- Моисеева, Е. Л.** Микробиология мясных и молочных продуктов при холодильном хранении / Е. Л. Моисеева. – М. : Агропромиздат, 1986. – 223 с.
- Мудрецова-Висс, К. А.** Микробиология / К. А. Мудрецова-Висс. – М. : Экономика, 2000. – 378 с.
- Мюллер, Г.** Микробиология пищевых продуктов животного происхождения / Г. Мюллер, Г. Литц, Г. Мюнх. – М. : Пищевая пром-ть, 1985. – 215 с.
- Мюллер, Г.** Микробиология пищевых продуктов растительного происхождения / Г. Мюллер, П. Литц, Г. Мюнх. – М. : Пищевая пром-ть, 1977. – 254 с.
- Промышленная** микробиология : учеб. пособие / З. А. Аркадьева [и др.] ; под ред. Н. С. Егорова. – М. : Выш. шк., 1989. – 300 с.
- Трушина, Т. П.** Микробиология, гигиена и санитария в торговле / Т. П. Трушина. – Ростов н/Д : Феникс, 2000. – 320 с.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

### Рецепты основных питательных сред

*Мясопептонный бульон:* пептона – 10 г, натрия хлористого – 5 г, мясной воды – до 1 000 мл (кипятить 15–20 мин, выкипевшую воду долить, установить значение рН = 7,2–7,4, стерилизовать при температуре 120°C в течение 20 мин).

*Мясопептонный агар (МПА):* агар-агара – 15–30 г (в зависимости от необходимой плотности Среды), мясопептонного бульона – до 1 000 мл, рН = 7,2–7,4 (стерилизовать при температуре 120°C в течение 20 мин).

*МПА с углеводами (глюкозой, лактозой, мальтозой, сахарозой):* используется заводского производства и состоит из смеси агара, гидролизата из рыбы, натрия фосфорнокислого, хлористого, соответствующего сахара и индикаторов – водного голубого и розоловой кислоты (стерилизовать при температуре 120°C в течение 20 мин).

*Сусло-агар:* агар-агара – 1,8 г, надосадочной жидкости стерильного пивного сусла – до 100 мл (нагреть до растворения); рН = 6,4–6,5 (стерилизовать при температуре 110°C в течение 30 мин).

*Среда Кесслера:* пептона – 10 г, желчи жидкой – 50 мл, воды дистиллированной – до 1 000 мл; кипятить 20–30 мин, фильтровать через ватно-марлевый фильтр, добавить 2,5 г лактозы и восстановить водой объем до 1 000 мл, рН = 7,4–7,6, добавить 2 мл 1%-ного водного раствора генцианвиолета; стерилизовать при температуре 120°C в течение 15 мин.

*Среда Симонса:* агара – 20 г, натрий-аммония фосфорнокислого – 1,5 г, магния сернокислого – 0,2 г, натрия лимоннокислого нейтрального – 2,5 г, воды дистиллированной – до 1 000 мл (стерилизовать в автоклаве при температуре 120°C в течение 15 мин, добавить 1 мл 0,5%-ного спиртового раствора бромтимолового синего).

*МПА с крахмалом:* на 100 мл МПА добавить 1 г крахмала, перекипятить и стерилизовать при температуре 120°C в течение 20 мин.

*Агар-агар* – сложный полисахарид, получаемый из некоторых морских водорослей; используется для получения плотных питательных сред, так как в воде образует гели, плавящиеся при температуре 100°C, а затвердевающие – при температуре около 40°C.

## *СОДЕРЖАНИЕ*

Пояснительная записка .....	4
Тематика лабораторных работ .....	4
Задания лабораторных работ и методические указания по их выполнению .....	5
<b>Работа 1. Устройство и оборудование микробиологической лаборатории. Техника микроскопирования и культивирования микроорганизмов.....</b>	<b>5</b>
Задание 1. Изучение устройства и оборудования микробиологической лаборатории. Устройство биологического микроскопа и правила работы с ним .....	5
Задание 2. Техника микроскопирования микроорганизмов. Приготовление мазков	9
Задание 3. Культивирование микроорганизмов. Свойства и классификация питательных сред.....	12
Задание 4. Изучение методов стерилизации в микробиологии.....	13
<b>Работа 2. Морфология совершенных и несовершенных грибов. Получение накопительных культур протeya, сенной и картофельной палочек.....</b>	<b>16</b>
Задание 1. Морфология совершенных грибов.....	16
Задание 2. Морфология несовершенных грибов .....	18
Задание 3. Изучение морфологии дрожжей.....	19
Задание 4. Выделение накопительных культур.....	20
<b>Работа 3. Морфология бактерий. Изучение культурально-морфологических свойств накопительных культур. Получение чистых культур микроорганизмов.....</b>	<b>21</b>
Задание 1. Изучение культурально-морфологических свойств накопительных культур протeya, сенной и картофельной палочек.....	22
Задание 2. Выделение чистых культур.....	23
<b>Работа 4. Определение родовой принадлежности по культуральным и морфологическим признакам выделенных в чистую культуру микроорганизмов .....</b>	<b>28</b>
Задание 1. Изучение чистых культур протeya, картофельной и сенной палочек .....	29
Задание 2. Определение подвижности культур микроорганизмов.....	29
Задание 3. Ознакомление с определителями бактерий.....	30
<b>Работа 5. Изучение болезней плодов и овощей, продуктов их переработки, вызываемых микроорганизмами.....</b>	<b>33</b>
Задание 1. Макроскопические методы определения диагноза заболевания	34
Задание 2. Микроскопические методы определения диагноза заболевания	35
<b>Работа 6. Изучение микрофлоры молока и молочных продуктов .....</b>	<b>35</b>
Задание 1. Отбор пробы .....	36
Задание 2. Метод редуктазы.....	38
Задание 3. Микроскопический анализ кисломолочных продуктов ....	40
Задание 4. Микробиологический анализ сыра.....	41

Задание 5. Микробиологический анализ сливочного масла .....	42
<b>Работа 7. Определение качества мяса, мясных продуктов, рыбы и рыбных продуктов по микробиологическим показателям .....</b>	<b>42</b>
Задание 1. Микроскопическое исследование мяса.....	43
Задание 2. Количественный и групповой анализ микрофлоры мяса .....	44
Задание 3. Микробиологическое исследование вареных колбас .....	44
Задание 4. Микробиологическое исследование рыбы .....	45
<b>Работа 8. Микробиологическое исследование муки и хлебобулочных изделий .....</b>	<b>46</b>
Задание 1. Определение общей обсемененности муки.....	46
Задание 2. Определения подъемной силы дрожжей (по методу Островского).....	47
<b>Работа 9. Санитарно-микробиологические исследования на предприятиях общественного питания и в организациях торговли</b>	<b>47</b>
Задание 1. Определение количества микроорганизмов в воздухе .....	48
Задание 2. Определение количества микроорганизмов в воде .....	49
Задание 3. Обнаружение кишечной палочки в смывах с рук и одежды персонала, торгового инвентаря .....	49
Задание 4. Определение микробного числа в смывах со столов, разделочных досок и других объектов .....	50
Список рекомендуемой литературы .....	51
Приложение .....	52

Учебное издание

## **МИКРОБИОЛОГИЯ**

**Практикум  
к лабораторным занятиям  
для студентов специальности 1-25 01 09  
«Товароведение и экспертиза товаров»  
специализации 1-25 01 09 01 «Товароведение  
и экспертиза продовольственных товаров»**

Авторы-составители:  
**Ухарцева** Ирина Юрьевна  
**Гулевич** Валентина Михайловна  
**Тюлькова** Елена Григорьевна

Редактор Е. Г. Привалова  
Технический редактор Н. Н. Короедова  
Компьютерная верстка Л. Ф. Кириленкова

Подписано в печать 29.02.08. Бумага типографская № 1.  
Формат 60 × 84 1/16. Гарнитура Таймс. Ризография.  
Усл. печ. л. 5,81. Уч.-изд. л. 6,1. Тираж 130 экз.  
Заказ №

Учреждение образования  
«Белорусский торгово-экономический  
университет потребительской кооперации».  
246029, г. Гомель, просп. Октября, 50.  
ЛИ № 02330/0056814 от 02.03.2004 г.

Отпечатано в учреждении образования  
«Белорусский торгово-экономический  
университет потребительской кооперации».  
246029, г. Гомель, просп. Октября, 50.