

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
КЕМЕРОВСКИЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ
ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

И.А. Еремина, О.В. Кригер

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

Учебное пособие

Для студентов вузов

Кемерово 2005

УДК
ББК
Е

Рецензенты:

Н.А. Егорова, канд. биол. наук, доцент
Е.П. Кондратенко, докт. с/х наук, профессор

*Рекомендовано редакционно-издательским советом
Кемеровского технологического института
пищевой промышленности*

Еремина И.А., Кригер О.В.

Е Лабораторный практикум по микробиологии: Учебное пособие. - /
Кемеровский технологический институт пищевой промышленности. –
Кемерово, 2005. - 112 с.
ISBN

Лабораторный практикум состоит из двух разделов.

В первой части изложены современные методы микроскопирования различных групп микроорганизмов, принципы составления и способы стерилизации питательных сред для проведения микробиологического анализа, приводятся наиболее часто используемые методы получения чистых и накопительных культур.

В разделе специальной микробиологии приведены методы, позволяющие оценить качественный и количественный состав микрофлоры различных групп пищевых продуктов для оценки их безопасности в соответствии с существующими требованиями нормативной документации. Приводятся также методики, позволяющие определить качество заквасок и производственных дрожжей.

Пособие предназначено для студентов всех технологических специальностей и бакалавров-технологов, а также представляет интерес для работников микробиологических лабораторий пищевых производств, магистрантов и аспирантов.

УДК
ББК

ISBN

ВВЕДЕНИЕ

Цель настоящего пособия – помочь студентам технологических специальностей направлений 655600, 655700, 655900 овладеть основными навыками проведения микробиологических исследований. Это способствует лучшему усвоению программы курсов «Микробиология», «Биология и микробиология» и «Техническая микробиология» в соответствии с действующими государственными стандартами образования.

Лабораторный практикум состоит из общего и специального разделов. Общий раздел знакомит студентов с организацией микробиологической лаборатории на пищевых предприятиях, ее оборудованием и приборами, современными способами микроскопирования, помогает овладеть техникой микробиологических исследований. Особое внимание уделено правилам работы с культурами микроорганизмов, методами приготовления питательных сред, их стерилизации, получения накопительных и выделения чистых культур микроорганизмов. Приведены достаточно подробные сведения о морфолого-культуральных свойствах микроорганизмов, встречающихся в пищевых производствах, методах их культивирования.

В специальной части студенты ознакомятся с организацией микробиологического и санитарно-гигиенического контроля на пищевых предприятиях, что позволит им более глубоко изучить микробиологические основы отрасли, в которой им предстоит работать. В этой части пособия приводятся также микробиологические критерии безопасности пищевых продуктов, методики микробиологического исследования сырья, полуфабрикатов и готовой продукции в соответствии с требованиями нормативной документации и методикой изучения качественного состава микрофлоры различных пищевых продуктов.

Материал по каждому занятию излагается в следующей последовательности: кратко формулируется цель занятия, приводится перечень необходимого оборудования и материалов, излагается теоретический материал по теме, определяется конкретное задание и порядок его выполнения, даются рекомендации по оформлению результатов исследований. По каждой теме разработаны контрольные вопросы, которые помогут студентам хорошо подготовиться к защите лабораторной работы.

В приложении имеются сведения по приготовлению некоторых питательных сред, красителей, а также приводятся нормируемые микробиологические показатели по отдельным группам пищевых продуктов.

Ввиду сложности некоторых методов и длительности выращивания микроорганизмов в отдельных случаях часть лабораторного материала готовится заранее сотрудниками кафедры, но методика приготовления его приводится.

ОБЩАЯ ЧАСТЬ

УСТРОЙСТВО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Современная микробиологическая лаборатория представляет собой комплекс помещений, оборудования и приборов, позволяющих использовать различные приемы для выращивания микроорганизмов, выделения их чистых культур, изучения морфологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств.

Помещения лаборатории и необходимое оборудование. Лаборатория включает комнаты для проведения исследований и подсобные помещения.

Под *рабочие комнаты* отводят светлые просторные помещения, стены которых на высоту до 170 см от пола окрашивают в светлые тона масляной краской или выкладывают кафельной плиткой, а пол покрывают линолеумом. Такого рода отделка позволяет проводить влажную уборку с применением растворов дезинфицирующих веществ. Комнаты лаборатории должны хорошо проветриваться. В число рабочих комнат входят: бокс (для посева микроорганизмов), термостатная, комната для проведения микроскопических и биохимических исследований. Бокс – специальное изолированное помещение, разделенное на две части: рабочее помещение и предбоксник, что исключает резкую циркуляцию воздуха и занесение микроорганизмов извне. В боксе устанавливают стол, стулья, на стены подвешивают бактерицидные лампы на высоте 2 м от пола. Перед работой помещение бокса моют и дезинфицируют, а после влажной уборки в течение 30-60 мин проводят стерилизацию воздуха бактерицидными лампами. В термостатной устанавливают термостаты, которые предназначены для выращивания микроорганизмов на питательных средах при постоянной температуре. В лаборатории устанавливают несколько термостатов с разной температурой, благоприятной для развития отдельных групп микроорганизмов.

Большое значение для успешной работы имеет правильная организация *рабочего места микробиолога*. Лабораторный стол должен быть хорошо освещен солнечным или искусственным светом. За каждой группой студентов закрепляется постоянное рабочее место. В зависимости от темы занятия рабочее место оснащается необходимыми материалами и оборудованием: спиртовкой; штативом под пробирки; бактериологической петлей или препаровальной иглой; набором красок и реактивов для окраски препаратов; микроскопом; лотком с рельсами для размещения предметных стекол при окраске препаратов; промывалкой или колбой с водой и трубкой (для промывки окрашенных препаратов); предметными и покровными стеклами; флаконом с иммерсионным маслом; фильтровальной бумагой; марлей, карандашом или маркером по стеклу и т.д.

К *подсобным помещениям* относятся автоклавная или стерилизационная, моечная, средоварочная, помещение для хранения посуды и питательных сред.

В стерилизационной устанавливается паровой стерилизатор, в котором паром под давлением происходит стерилизация питательных сред и лабораторной посуды. В стерилизационной обычно устанавливают также сушильный шкаф с терморегулятором температуры от 40 до 200 °С (для сушки и стерилизации лабораторной посуды).

Посуда для проведения микробиологических исследований. Для микробиологических исследований необходима различная стеклянная посуда. *Чашки Петри* (диаметр 10 см, высота 1,5 см) применяют для выделения чистых культур, количественного учета микроорганизмов, анализа качественного состава микрофлоры на плотных питательных средах и других исследований; *стеклянные поплавки* - для изучения процессов брожения; *пробирки биологические* – для хранения чистых культур и проведения микробиологических исследований; *пастеровские пипетки* с оттянутым капилляром. Кроме специальной посуды широко используют обычную *химическую посуду*: колбы плоскодонные конические Эйлера, круглодонные, мерные, пипетки, градуированные на 1 мл, пипетки Мора, мензурки, мерные цилиндры, бюксы, склянки и т.д.

Колбы и пробирки, используемые для приготовления и стерилизации питательных сред и выращивания микроорганизмов, закрывают ватно-марлевыми пробками, которые изготовляют вручную или при помощи специальной машины. Правильно изготовленная пробка для пробирок должна: иметь длину 3-4 см, умеренно туго входить в пробирку, быть плотной и не менять своей формы при многократном применении.

Инвентарь. В микробиологической практике применяют петли, иглы, пинцеты, ножницы, пластмассовые и металлические штативы для пробирок, металлические лотки и др.

Петли и иглы изготовляют из платиновой, никелевой или хромоникелевой проволоки и закрепляют в металлическом петледержателе.

Правила работы в микробиологической лаборатории

1. В лабораторию запрещается входить в верхней одежде и класть на столы сумки, пакеты и другие личные вещи;
2. В лаборатории разрешается работать только в халатах;
3. На каждом занятии назначаются дежурные, которые следят за порядком и за выполнением каждым студентом правил работы и поведения в лаборатории;
4. За каждой группой студентов (3 человека) закрепляется постоянное рабочее место, которое должно содержаться в порядке на протяжении всего занятия;
5. Бактериологические петли и препаровальные иглы в ходе работы обеззараживаются прокаливанием над пламенем горелки, предметные стекла и пипетки после работы помещаются в кастрюльку с дезинфицирующим раствором;
6. В лаборатории категорически запрещается применять пищу;
7. Не допускаются лишние хождения, резкие движения, посторонние разговоры (особенно во время посева микроорганизмов);
8. Категорически запрещается выносить микробные культуры за пределы лаборатории;

9. По окончании работы рабочее место необходимо привести в порядок, а лотки тщательно помыть с порошком или пемоксолью до бесцветной смывной воды.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И СТЕРИЛИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, ПОСУДЫ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Цель работы: Ознакомиться с требованиями, предъявляемыми к питательным средам, с различными классификациями и химическим составом питательных сред, правилами их приготовления и целью использования. Приобрести навыки подготовки посуды для проведения микробиологических исследований. Ознакомиться с различными способами стерилизации питательных сред, посуды, инструментов, с устройством парового стерилизатора и принципом его работы.

Оборудование, материалы: Паровой стерилизатор; сушильный шкаф; посуда: чашки Петри; градуированные пипетки на 1 мл, пробирки, плоскодонные конические или круглодонные колбы разного объема; штатив для пробирок; ватно-марлевые пробки; пергаментная бумага; ножницы; вата, нитки, марля, агар-агар; сухие питательные среды: среда Сабуро, мясопептонный агар (МПА), среды Кесслера, Эндо и др.

1.1 КРАТКИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1.1.1 Питательные среды

Разнообразные питательные вещества, в которых нуждаются микроорганизмы и которые используются ими для синтеза основных компонентов клетки, роста, размножения и для получения энергии называются ***питательными веществами***, а среда, содержащая питательные вещества, является ***питательной средой***.

По типу питания микроорганизмы, которые встречаются в пищевых продуктах, относятся к ***хемоорганогетеротрофам***. Это значит, что органические вещества, содержащиеся в питательной среде, являются источником углерода, энергии и электронов. Потребности микроорганизмов в тех или иных органических веществах зависят от их видовой принадлежности, и, следовательно, от наличия в клетках и активности соответствующих ферментных систем.

В качестве *источника углерода* микроорганизмы используют углеводы, органические и аминокислоты, спирты, липиды и т.д. Как правило, лучше усваиваются низкомолекулярные органические соединения. Высокомолекулярные органические вещества могут быть использованы для питания только теми микроорганизмами, которые способны синтезировать

соответствующие гидролитические экзоферменты. Органические вещества и вода являются также основными источниками водорода и кислорода.

Источником азота для хемоорганогетеротрофов могут быть различные органические и минеральные соединения: белковые вещества, пептоны, аминокислоты, соли аммония, нитраты.

В среде обязательно должны присутствовать *макроэлементы* (P, S, Ca, Mg, K, Fe, Na, Cl), которые вносятся в питательную среду в виде катионов питательных солей.

Микроэлементы чаще всего нет необходимости специально вносить в среду, так как большинство микроэлементов является примесью солей макроэлементов или попадают в среду с частицами пыли, из стеклянной посуды или в составе водопроводной воды.

Для многих микроорганизмов нужны в малых дозах *факторы роста*. Факторы роста обязательно вносят в среды для культивирования *ауксотрофных микроорганизмов* (микроорганизмов, которые не способны синтезировать сами те или иные органические вещества, которые необходимы для роста и развития), а также добавляют в питательные среды в малых количествах для ускорения роста микроорганизмов, способных эти вещества синтезировать самостоятельно. К факторам роста относятся отдельные аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, жирные кислоты, витамины и др., а также природные субстраты, содержащие эти соединения (морковный сок, кукурузный экстракт, автолизат дрожжей, гидролизаты растительного сырья и т.д.).

Питательные среды имеют исключительное значение в микробиологии. Правильный подбор питательной среды обеспечивает возможность выделения микроорганизмов из мест обитания, получения накопительных и чистых культур, изучения их морфологии и биохимических особенностей, способствует быстрой и правильной диагностике инфекционных заболеваний, дает возможность для количественного учета микроорганизмов в различных объектах (в пищевых продуктах, в воздухе, в воде, почве). С помощью питательных сред получают также биомассу полезных для народного хозяйства микроорганизмов и биологически активные целевые продукты.

Требования, предъявляемые к питательным средам

1. *В среде должны быть все необходимые для роста и развития химические элементы;*
2. *Среда должна быть сбалансирована по химическому составу.* Это значит, что соотношение химических элементов питательной среды и главным образом соотношение органогенных элементов - C:N должно примерно соответствовать этому соотношению в клетке;
3. *Среды должны иметь достаточную влажность,* обеспечивающую возможность диффузии питательных веществ в клетку. Для грибов эта влажность обеспечивается содержанием влаги в субстрате не менее 12 %, для бактерий – не менее 20 %.

4. *Среда должна иметь определенное значение pH среды.* Среди микроорганизмов различают *ацидофилы* (кислотолюбивые микроорганизмы), *алкалофилы* (щелочелюбивые микроорганизмы) и *нейтрофилы* (лучше всего растут в нейтральной среде с pH около 7,0). К ацидофилам относятся грибы и дрожжи. Большинство бактерий – нейтрофилы, для которых активная кислотность среды около 4 ед. pH является губительной. Следует помнить, что при стерилизации среды и в процессе культивирования микроорганизмов, кислотность среды может сильно изменяться. Во избежание изменения pH в среду добавляют буферные системы (например: фосфатный буфер), CaCO_3 (для нейтрализации образующихся в результате культивирования органических кислот), вещества органической природы, обладающие буферными свойствами (например: аминокислоты, полипептиды, белки) и др.;
5. *Среды должны быть изотоничными* для микробной клетки, т. е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки.
6. *Среды должны обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом (rh_2)*, определяющим насыщение ее кислородом. По шкале от 0 до 41 этим индексом можно обозначить любую степень аэробности: насыщенный кислородом раствор обозначают $rh_2=41$, насыщенный водородом $rh_2=0$. Облигатные анаэробы размножаются при rh_2 не выше 5, аэробы – не ниже 10.
7. *Среды должны быть стерильными*, что обеспечивает рост чистых культур микроорганизмов.

Классификация питательных сред

По **консистенции** питательные среды делятся на жидкие, плотные и сыпучие.

Жидкие среды применяются для накопления биомассы или продуктов обмена микроорганизмов, для обновления долго хранящихся культур, для поддержания и хранения тех чистых культур, которые плохо растут на плотных средах.

Плотные среды необходимы для выделения и описания культуральных свойств чистых культур микроорганизмов, так как на них можно получить изолированные колонии (*колония* - популяция микроорганизмов, выросших из одной клетки). Плотные питательные среды используются также для количественного учета микроорганизмов в пищевых продуктах, других объектах внешней среды и для хранения чистых культур.

Плотные среды готовятся из жидких путем добавления гелеобразующих веществ: агар-агара, желатина, геля кремнекислого (силикагеля).

Лучшим гелеобразующим веществом является *агар-агар*, получаемый из водорослей. Это сложный полисахарид, который образует гель с точкой плавления $96-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ и температурой застывания около $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Поэтому на агаризованных средах можно культивировать почти все микроорганизмы. Кроме того, агар-агар очень редко используется микроорганизмами в качестве

питательного субстрата. Для уплотнения жидкой среды в нее вносят в зависимости от степени очистки от 1,5 до 2,5 % агар-агара.

В отличие от агар-агара *желатин* – это вещество белковой природы, которое получается из костей и хрящей животных при их вываривании, поэтому многие микроорганизмы используют желатин в качестве питательного субстрата и к концу культивирования среда с желатином разжижается. Ограниченное использование желатина в качестве уплотнителя для плотных питательных сред связано также с тем, что по сравнению с агар-агаром он образует менее прочный гель, который плавится при 23-25 °С и застывает при 20 °С, в то время как большинство микроорганизмов развивается при температуре от 25 до 37 °С.

Если требуется получить плотные среды, не содержащие, органических компонентов, или синтетические среды с определенным количественным и качественным составом, то в качестве уплотнителя применяют кремневокислый гель. Получают его путем смешивания равных объемов соляной кислоты с удельной массой 1,1 и жидкого стекла ($\text{Na}_2 \text{SiO}_3$ или $\text{K}_2 \text{SiO}_3$) с последующей разливкой по 25-30 мл в чашки Петри и выдержкой 1-2 ч.

Сыпучие среды применяют в основном в промышленной микробиологии. К таким средам относятся разваренное пшено, отруби, кварцевый песок, смоченный питательным раствором. Такие среды используются для культивирования аэробных микроорганизмов.

По *происхождению и составу* питательные среды делятся на натуральные (естественные), синтетические (искусственные) и полусинтетические.

Натуральные среды готовятся из продуктов животного и растительного происхождения. Они содержат все ингредиенты, необходимые для роста и развития микроорганизмов. Основным недостатком этих сред является то, что они имеют сложный и непостоянный состав. Натуральные среды используют для выращивания микроорганизмов, накопления биомассы, хранения чистых культур, но они мало пригодны для изучения обменных процессов микроорганизмов. Такими средами являются отвары злаков, трав, овощные и фруктовые соки, различные экстракты, мясной бульон, автолизат дрожжей, молоко, молочная сыворотка, гидролизаты из растительного сырья и т.д. Наиболее часто применяемыми натуральными питательными средами являются мясопептонный агар (МПА) и мясопептонный бульон (МПБ), предназначенные для культивирования бактерий, а также не охмеленное пивное сусло и сусло-агар, используемые для выращивания и накопления биомассы грибов и дрожжей.

Синтетические среды имеют в своем составе химически чистые органические и неорганические соединения в строго указанных концентрациях. По набору компонентов синтетические питательные среды могут быть сложными (среды для выращивания молочнокислых бактерий) и довольно простыми. Такие среды применяются для исследования обмена веществ, выяснения закономерностей роста или биосинтеза какого-либо метаболита и т.д. Наиболее часто в практической работе используют синтетическую среду

Чапека для выращивания грибов и среду Ридер для дрожжей. Состав этих сред приведен в приложении 2. Основным недостатком синтетических сред является то, что на таких средах микроорганизмы очень долго растут.

Полусинтетические среды в своем составе содержат химически чистые органические и неорганические вещества, (как и в синтетических средах) и вещества растительного или животного происхождения в качестве факторов роста для ускорения роста и развития микроорганизмов. Цель использования полусинтетических сред та же, что и синтетических. Так как натуральные компоненты вносятся в небольших количествах, то их химический состав не учитывается при изучении обменных процессов тех или иных микроорганизмов.

По *назначению* среды делятся на универсальные (основные), избирательные (накопительные, элективные) и дифференциально-диагностические.

Универсальные среды используются для выращивания многих видов микроорганизмов. К универсальным средам, используемым для выращивания бактерий, относятся мясопептонный агар и бульон (МПА, МПБ), среда для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (среда для определения КМАФАнМ). Грибы и дрожжи хорошо растут на не охмеленном пивном сусле, сусло-агаре (СА), среде Сабуро.

Избирательные среды обеспечивают развитие только определенных микроорганизмов или группы родственных видов и непригодны для роста других. В такие среды, как правило, добавляют вещества, избирательно подавляющие развитие сопутствующей микрофлоры. Избирательные среды применяют для выделения определенных микроорганизмов из мест их естественного обитания и для получения накопительных культур. В качестве накопительных питательных используют, например жидкие среды Кесслера (используется для накопления бактерий группы кишечной палочки), Мюллера и Кауфмана (для выявления сальмонелл). Элективными средами могут быть плотные питательные среды, такие как молочно-солевой агар (МСА) и желточно-солевой агар (ЖСА) – для выявления и количественного учета в пищевых продуктах коагулазоположительных стафилококков, кровяной агар – для выявления гемолитических стрептококков, агар с гидролизированным молоком и мелом – для количественного учета молочнокислых бактерий.

Дифференциально-диагностические среды используются для определения видовой принадлежности исследуемого микроба, основываясь на особенностях его обмена веществ. Состав этих сред позволяет четко выделить наиболее характерные свойства изучаемого микроорганизма. Примером таких сред является плотная среда Эндо, применяемая для определения бактерий группы кишечной палочки, в состав которой входит лактоза, насыщенный спиртовой раствор фуксина, обесцвеченного перед добавлением в среду 10 % водным раствором сульфата натрия (образуется бесцветная фуксин-сернистая кислота. Кишечная палочка на такой среде ферментирует лактозу с образованием альдегидов, вследствие чего бесцветная фуксин-сернистая кислота переходит в

фуксин-сернистое соединение с образованием фуксина, который окрашивает колонии кишечной палочки в красный цвет с металлическим блеском.

1.1.2 Методы стерилизации питательных сред, посуды, инвентаря

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

Стерилизация должна обеспечивать уничтожение всей микрофлоры, патогенной и непатогенной, присутствующей в данном объекте. Она не должна приводить к порче материала или изменению его физического или химического состояния. Поэтому в зависимости от физических свойств стерилизуемых объектов и цели стерилизации применяют различные методы обеспложивания: горячие (влажная, дробная, сухая стерилизация) и холодные (механическая стерилизация, ионизация, стерилизация ультразвуком, ультрафиолетовыми лучами). Основное значение имеет тепловое воздействие на объект.

Методы, основанные на термической обработке стерилизуемых объектов

Губительное действие высокой температуры обусловливается повреждением коллоидного состояния плазмы, денатурацией белка с последующей коагуляцией его, а также нарушением ферментных систем микроорганизмов.

Различают ***влажные и сухие способы тепловой стерилизации***.

Влажные способы используются, главным образом, для стерилизации питательных сред. К таким способам относятся стерилизация паром под давлением, стерилизация текучим паром (дробная стерилизация) и тиндализация.

Стерилизация паром под давлением – самый эффективный в бактериологической практике способ стерилизации питательных сред и посуды, так как с его помощью быстро достигается полное и надежное обеспложивание. Этот способ стерилизации основан на том, что образующийся при кипячении воды пар не выходит наружу, а скапливаясь в замкнутом пространстве, повышает давление. При создании избыточного давления возрастает температура кипения воды и температура пара. Стерилизацию паром под давлением осуществляют в паровых стерилизаторах, принцип работы и устройство которого описаны в разделе 1.1.3.

Стерилизация текучим паром используется для сред, которые нельзя нагревать выше температуры 100 °С. Стерилизация проводится при 100 °С (температура парообразования) по 30...60 минут в течение 3 дней с промежутками в 18-20 часов, во время которых материал выдерживается в термостате или при комнатной температуре. Поэтому этот способ называют еще дробной стерилизацией. В основу способа дробной стерилизации положен следующий принцип: при нагревании до 100 °С в течение 30...60 минут погибают все вегетативные клетки, а споры остаются жизнеспособными. В промежутке между стерилизацией споры прорастают в вегетативные клетки.

Через сутки проводят повторную стерилизацию. Обычно после третьей стерилизации достигается полное обеспложивание объекта. Стерилизацию текучим паром осуществляют в аппаратах Коха или текучепаровых аппаратах (кипятильниках Коха).

Тиндализация – это дробная стерилизация при низкой температуре – 56...58 °С. Применяют этот способ при стерилизации сред, которые нельзя нагревать до 100 °С. Такие среды подвергают нагреванию в течение 5...6 дней подряд по 1 часу ежедневно (в 1-й день – в течение 2 часов). В промежутках между прогреванием стерилизуемая жидкость хранится в термостате. При этом оставшиеся в живых споры прорастают в вегетативные клетки, которые погибают при последующем нагревании. Тиндализацию проводят в специальных приборах с терморегулятором или на водяных банях.

Сухие способы. При работе в микробиологической лаборатории из сухих способов термической стерилизации используются следующие:

Прокаливание на огне (фламбирование) очень быстрый и надежный способ стерилизации бактериологических петель, препаровальных игл перед посевами. Этим способом можно стерилизовать также мелкие металлические предметы (пинцеты, скальпели) и предметные стекла. Осуществляют прокалывание над пламенем горелки.

Стерилизация сухим жаром (сухим нагретым воздухом) используется для стерилизации микробиологической посуды (пипеток, чашек Петри), песка. Осуществляют стерилизацию сухим жаром при температуре 150-170 °С в течение 1...1,5 часов в печах Пастера или в сушильных шкафах.

Методы холодной стерилизации

Механическая стерилизация (фильтрование). Этот способ применяется для стерилизации сред в тех случаях, когда их нельзя подвергать нагреванию. При механической стерилизации стерилизуемые жидкости фильтруют через специальные фильтровальные приборы, которые имеют настолько мелкие поры, что на своей поверхности задерживают взвешенные в жидкости частицы, в том числе и микробы. Для фильтрации в микробиологической практике применяют различные фильтровальные приборы (фильтры Зейтца, свечи Шамберлана, Мандлера, Беркефельда и др.).

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

Химическая стерилизация используется также для дезинфекции оборудования, помещений, использованной посуды и отработанного микробиологического материала. В качестве дезинфицирующих веществ широкое применение нашли химические соединения, содержащие активный хлор (хлорамин, хлорная известь).

Стерилизация ультрафиолетовыми лучами. Этот способ стерилизации используется для стерилизации воздуха в микробиологическом боксе и в лаборатории перед проведением микробиологических исследований. Стерилизацию ультрафиолетовыми лучами проводят с помощью бактерицидных ламп.

1.1.3 Устройство парового стерилизатора и принцип его работы

Устройство стерилизатора

Основными частями стерилизатора являются: *стерилизационная камера* - служит для размещения стерилизуемых объектов; *парогенератор* – служит для выработки пара (в парогенераторе находятся нагревательные элементы - тэны, используемые для нагрева воды и получения пара, и датчики уровня, которые нужны для предотвращения выхода из строя нагревательных элементов); *система трубопроводов* – для соединения сборочных единиц стерилизатора; *электрошкаф* – для управления электрической системой стерилизатора; *манометр электроконтактный* – для наблюдения за давлением в парогенераторе и поддержания его работы в автоматическом режиме; *моновакуумметр* – для наблюдения за давлением и разряжением в стерилизационной камере; *клапан предохранительный* - для сброса пара при превышении давления в парогенераторе; *колонка водоуказательная* (водомерная трубка) – для наблюдения за уровнем жидкости в парогенераторе; *вентили* – для управления работой стерилизатора.

Принцип действия пневмогидравлической и электрической систем парового стерилизатора

Заключается в следующем:

Вода поступает по водопроводу в парогенератор. Контроль за уровнем жидкости в парогенераторе осуществляют с помощью водомерной трубки. После включения стерилизатора, начинают нагреваться тэны, благодаря чему вода нагревается до рабочей температуры. В результате образуется пар. При достижении в парогенераторе давления пара 0,11 МПа открывается вентиль «Пар в камеру» и вентиль «Слив конденсата». Происходит продувка и прогрев стерилизационной камеры, после чего вентиль «Слив конденсата» закрывается. При достижении в стерилизационной камере рабочего давления (контролируется электроконтактным манометром) происходит отчет времени стерилизации. В процессе стерилизации происходит автоматическое включение и отключение стерилизатора с помощью электроконтактного манометра. Контроль за давлением в стерилизационной камере осуществляется моновакуумметром. После проведения стерилизации аппарат отключают от сети и перекрывают вентиль «Пар в камеру». Далее, по мере падения давления в стерилизационной камере до 0,06 МПа (контроль осуществляется по моновакуумметру) открывается вентиль «Вакуум». В стерилизационной камере создается разряжение. Происходит процесс сушки стерилизуемого материала. По истечении сушки открывается вентиль «Воздух в камеру». При этом

происходит выравнивание давления в стерилизационной камере с атмосферным давлением.

1.2 ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

Студенты знакомятся с принципами составления и классификацией питательных сред, методами стерилизации питательных сред, посуды, инвентаря, изучают устройство парового стерилизатора и принцип его работы и кратко конспектируют изложенный в теоретической части материал. Затем готовят посуду, питательные среды и ватно-марлевые пробки для проведения микробиологического анализа.

1.2.1 Приготовление посуды для проведения микробиологического анализа

Для проведения микробиологического анализа используют чашки Петри, которые герметично упаковываются в пергаментную бумагу и стерилизуются. Пипетки на 1 см³ закрывают ватными тампонами и также заворачивают в бумагу. Колбы закрывают ватно-марлевыми пробками и сверху делают колпачки из пергаментной бумаги.

Стерилизация посуды осуществляется в автоклаве при избыточном давлении 0,1 МПа в течение 30-40 минут или сухим жаром в сушильном шкафу или печи Пастера при 165-170 °С в течение 1-1,5 часа.

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

1.2.2 Приготовление питательных сред из промышленно выпускаемых сухих сред

Заключается в растворении определенного количества порошка в воде, доведении полученной смеси до кипения и кипячении в течение 5 минут. Далее (при необходимости) среда фильтруется через ватно-марлевый фильтр и разливается в пробирки или колбы, которые закрываются ватно-марлевыми пробками. Далее среды стерилизуют в автоклаве. С использованием сухих сред готовят мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), среду Сабуро, среду Кесслера, среду для определения мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (среда для определения КМАФАнМ), среду Эндо и др.

1.2.3 Приготовление питательных сред из отдельных компонентов

Проводится по методикам, описанным в приложении 2 данного лабораторного практикума.

Контрольные вопросы

- 1. Что такое питательные среды?***
- 2. Микроорганизмы, которые встречаются в пищевых продуктах, являются хемоорганогетеротрофами. Что это значит?***

3. Охарактеризуйте пищевые потребности хемоорганогетеротрофов.
4. Какие требования предъявляются к питательным средам?
5. Каким образом готовятся плотные питательные среды и для чего они используются?
6. Почему в качестве уплотнителя для питательных сред лучше использовать агар-агар, а не желатин?
7. На какие группы делятся питательные среды по происхождению и составу?
8. Что такое синтетические среды и в каких случаях они применяются?
9. Для каких целей используются универсальные, избирательные и дифференциально-диагностические среды?
10. Приведите примеры универсальных, избирательных и дифференциально-диагностических питательных сред.
11. Что такое стерилизация? Какие методы стерилизации Вам известны?
12. Какими способами можно стерилизовать посуду?
13. Какими из известных Вам способов можно стерилизовать питательные среды?
14. Как готовятся питательные среды и посуда для стерилизации?
15. Каково устройство и принцип работы парового стерилизатора?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2

УСТРОЙСТВО МИКРОСКОПА И ПРАВИЛА РАБОТЫ С НИМ. ВИДЫ МИКРОСКОПИИ. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ФИКСИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИЙ И ОКРАСКА ИХ ПРОСТЫМИ МЕТОДАМИ

Цель работы: Изучить устройство светового биологического микроскопа и освоить правила работы с ним. Ознакомиться с различными видами микроскопии. Приобрести навыки по приготовлению фиксированных препаратов бактерий и освоить технику окраски препаратов бактерий простыми методами.

Оборудование, материалы: Микроскоп; бактериологические петли; предметные стекла; спиртовка; иммерсионное масло; фильтровальная бумага; краска Муромцева; фуксин; лоток с рельсами; промывалка; кефир; чистые культуры бактерий: *Staphylococcus albus*, *Sarsina flava*; 96 %-ный этиловый спирт.

2.1 КРАТКИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

2.1.1 Устройство микроскопа и правила работы с ним

Микроскоп (от греч. *micros* – малый и *scopio* – смотрю) – это оптический прибор, состоящий из трех основных частей: механической, оптической и осветительной.

Устройство микроскопа

Схема светового биологического микроскопа представлена на рис. 1.

Механическая часть или штатив состоит из ножки, основания, тубусодержателя, предметного столика, монокулярной насадки (тубуса), револьверного устройства, рукоятки грубой фокусировки (макрометрического винта), рукоятки тонкой фокусировки (микрометрического винта).

Тубус – зрительная труба микроскопа. В верхнее отверстие тубуса свободно вставляется окуляр, на нижнем конце тубуса находится вращающееся вокруг своей оси револьверное устройство (револьвер), в которое ввинчиваются объективы. Вращая револьвер, можно быстро сменить объективы во время работы с микроскопом, подводя любой объектив под тубус. Объектив должен быть центрирован, т.е. установлен на оптическую ось микроскопа. Для этого револьвер поворачивают вокруг своей оси до появления щелчка.

Предметный столик служит для размещения на нем изучаемого препарата. Препарат закрепляют на столике зажимами (клеммами). В центре предметного столика находится отверстие для прохождения лучей света и освещения препарата. В некоторых конструкциях микроскопа предметный столик может передвигаться с помощью винтов, расположенных по периферии предметного столика. Это дает возможность рассмотреть препарат в различных полях зрения.

- 1 – окуляр
- 2 – монокулярная насадка
(тубус)
- 3 – револьверное
устройство
- 4 – объектив
- 5 – предметный столик
- 6 – конденсор
- 7 – корпус коллекторной
линзы
- 8 – патрон с лампой
- 9 – шарнир
- 10 – рукоятка
перемещения
кронштейна
конденсора
- 11 – рукоятка тонкой
фокусировки
(микрометрический
винт)
- 12 – рукоятка грубой
фокусировки
(макрометрический)

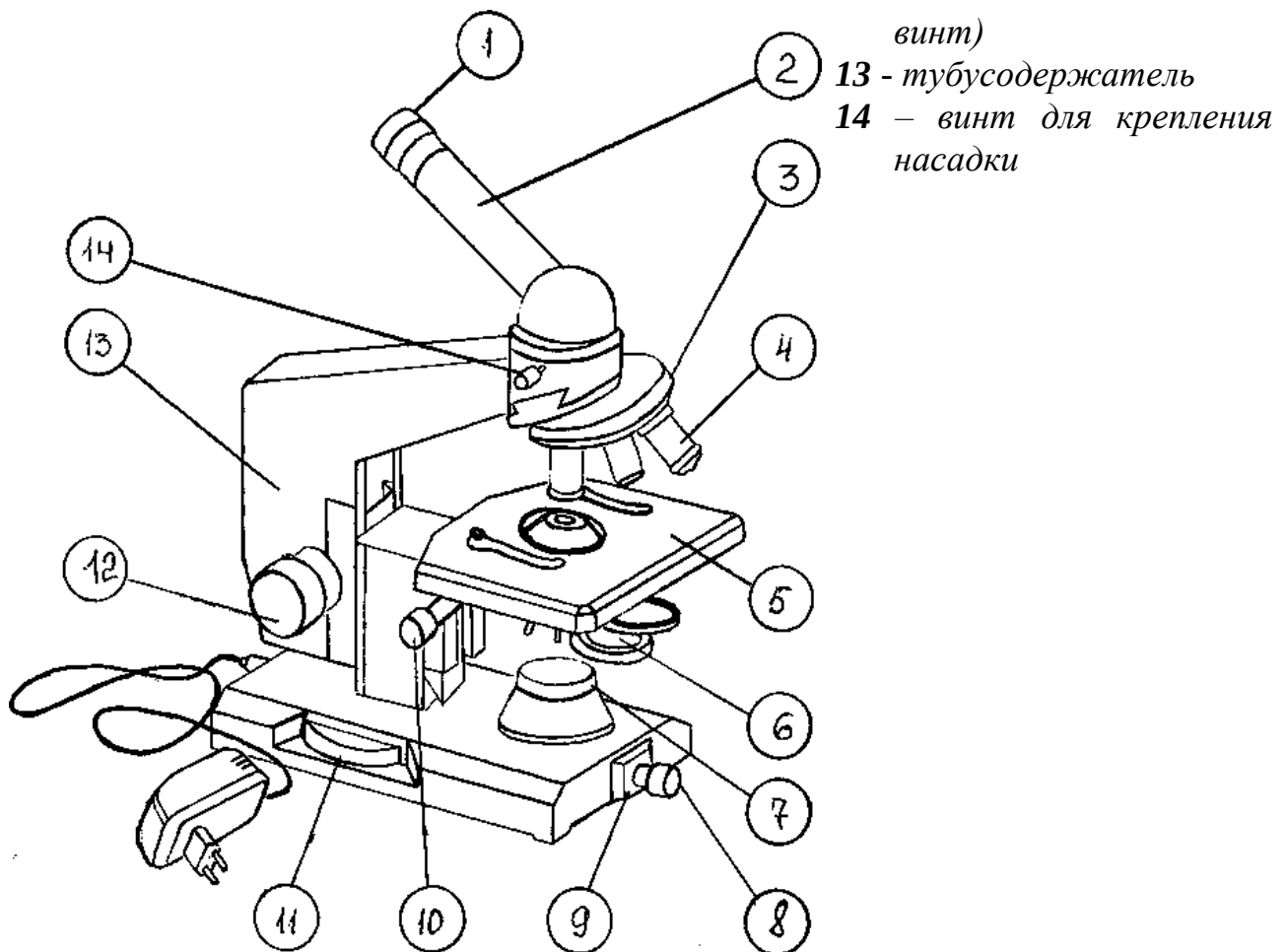


Рис. 1 Схема устройства светового биологического микроскопа

Рукоятки грубой и тонкой фокусировки (макро- и микровинты) служат для перемещения тубуса вверх и вниз, что позволяет установить его на необходимом расстоянии от препарата. При вращении винтов по часовой стрелке тубус опускается, а при вращении против часовой стрелки – поднимается. При вращении макрометрического винта объектив ориентировочно устанавливается на фокус, т.е. на то расстояние от препарата, при котором он делается видимым. Оборот макровинта позволяет переместить тубус на 20 мм. Микрометрический винт служит для точной установки на фокус. Полный оборот его перемещает тубус на 0,1 мм. С микровинтом следует обращаться очень осторожно: допустимо вращение микровинта не более чем на 180° в ту или иную сторону.

Оптическая часть является наиболее ценной частью микроскопа. Она состоит из объективов и окуляра.

Окуляр (от лат. *oculus* – глаз) состоит из двух плосковыпуклых линз, заключенных в общую металлическую оправу. Верхняя линза – глазная (увеличивающая), нижняя – собирающая. Расстояние между линзами равно полусумме их фокусного расстояния. У окуляров с большим увеличением фокус короче, поэтому меньше и длина окуляра. Между линзами имеется диафрагма, ограничивающая поле зрения и задерживающая краевые лучи света.

Отечественные микроскопы снабжены тремя сменными окулярами, увеличение которых указано на корпусе окуляра (x7; x10; x15).

Объективы ввинчиваются в гнезда револьверного устройства и состоят из системы линз, заключенных в металлическую оправу. Передняя (фронтальная) линза объектива является самой маленькой и единственной, дающей увеличение. Остальные линзы в объективе только исправляют недостатки полученного изображения (явления сферической и хроматической аберрации) и называются коррекционными.

В гнезда револьверного устройства ввинчиваются четыре объектива, увеличение которых указано на корпусе объектива (x8; x20; x40; x90 или 100). Каждый объектив характеризуется своим фокусным расстоянием (расстоянием между предметным стеклом и фронтальной линзой): объектив x8 имеет фокусное расстояние около 9 мм, объектив x40 – 0,65 мм, объектив x90 – 0,15 мм.

Объективы подразделяются на *сухие* и *иммерсионные*.

При работе с *сухими объективами* (x8, x20, x40) между фронтальной линзой и препаратом находится воздух. В этом случае лучи света проходят среды с различными показателями преломления (покровное стекло, воздух), часть их отклоняется и не попадает в объектив.

При работе с *иммерсионными объективами* (x90 или x100) для устранения светорассеяния расстояние между фронтальной линзой объектива и препаратом заполняют иммерсионным (кедровым) маслом, показатель преломления лучей света которого близок к показателю преломления лучей света, проходящего через стекло.

Общее увеличение микроскопа определяется как произведение увеличения объектива на увеличение окуляра. Например, если в работе используют окуляр x15, а под тубусом находится объектив x90, то увеличение рассматриваемого с помощью микроскопа объекта составит x1350.

Осветительная часть микроскопа состоит из двухлинзового конденсора, ирис-диафрагмы и патрона с низковольтной лампочкой накаливания, питающейся через понижающий трансформатор от сети напряжения 120...220 В.

Конденсор служит для лучшего освещения препарата. Он собирает световые лучи в пучок и направляет их через отверстие предметного столика на препарат. С помощью рукоятки для перемещения кронштейна конденсора его можно перемещать вверх и вниз, благодаря чему меняется угол сходимости лучей и, следовательно, степень освещения объекта. Чем выше положение конденсора, тем лучше освещен препарат.

Ирис-диафрагма располагается под конденсором и служит для регулировки потока света, поступающего в конденсор. Она состоит из металлических серповидных пластинок. Расширить или сузить отверстие диафрагмы можно с помощью специального рычажка. При вращении его по часовой стрелке отверстие ирис-диафрагмы увеличивается и, следовательно, увеличивается степень освещения объекта.

При работе с иммерсионными объективами степень освещения препарата должна быть максимальной, поэтому шторку ирис-диафрагмы открывают, а конденсор поднимают в крайнее верхнее положение.

При работе с сухими объективами, как правило, рассматривают неокрашенные объекты. Для достижения контрастности конденсор опускают вниз, а отверстие ирис-диафрагмы уменьшают.

Правила работы с микроскопом

1. На рабочем столе микроскоп ставят тубусодержателем к себе на расстоянии 3...5 см от края стола;
2. Включают микроскоп в сеть и устанавливают правильное освещение (см. раздел 2.1.1);
3. На предметный столик помещают исследуемый препарат и закрепляют его клеммами;
4. Под тубус помещают нужный объектив и с помощью макро и микровинтов устанавливают фокусное расстояние. Так, при работе с иммерсионными объективами на препарат предварительно наносят каплю иммерсионного масла и осторожно опускают тубусодержатель макровинтом до соприкосновения со стеклом. Затем, внимательно смотря в окуляр, очень медленно поднимают тубусодержатель, вращая его против часовой стрелки, до тех пор, пока не увидят изображение. Точную наводку объектива на фокус производят микрометрическим винтом. При работе с сухими объективами препарат вначале рассматривают с объективом х8. Поднимая с помощью макровинта тубусодержатель и внимательно смотря в окуляр, устанавливают фокусное расстояние (около 9 мм) и добиваются четкости изображения, используя микрометрический винт. Далее, двигая предметный столик или предметное стекло, устанавливают в центр поля тот участок препарата, в котором лучше всего виден изучаемый объект. Затем, вращая револьверное устройство вокруг своей оси, под тубус помещают объектив на х20 или х40. При этом под тубус не должен попасть объектив х90. В револьверном устройстве объективы располагаются таким образом, что если найдено изображение с объективом х8, то при рассмотрении препарата с объективами большего увеличения нужно слегка подрегулировать четкость изображения с помощью макро- и микрометрических винтов;
5. Во время микроскопирования необходимо держать оба глаза открытыми и пользоваться ими попеременно;
6. После окончания работы следует убрать препарат с предметного столика, опустить вниз конденсор, поставить под тубус объектив х8, удалить мягкой тканью или марлей, смоченной в спирте, иммерсионное масло с фронтальной линзы объектива х90, под объектив положить марлевую салфетку, опустить тубусодержатель.

2.1.2 Виды микроскопии

Основными характеристиками микроскопа являются *общее увеличение* и *разрешающая способность*.

Общее увеличение не характеризует качества изображения, которое может быть четким и нечетким.

Четкость получаемого изображения определяется *разрешающей способностью* микроскопа, т.е. той наименьшей величиной объектов или их деталей, которые можно увидеть с помощью этого прибора. Разрешающая способность зависит от длины проходящего через объект света, показателя преломления оптической среды (показатель преломления воздуха равен 1,0; иммерсионного масла – 1,516; стекла – 1,520) и апертурного угла объектива. Эту зависимость вывел немецкий физик Эрнст Аббе во второй половине XIX века:

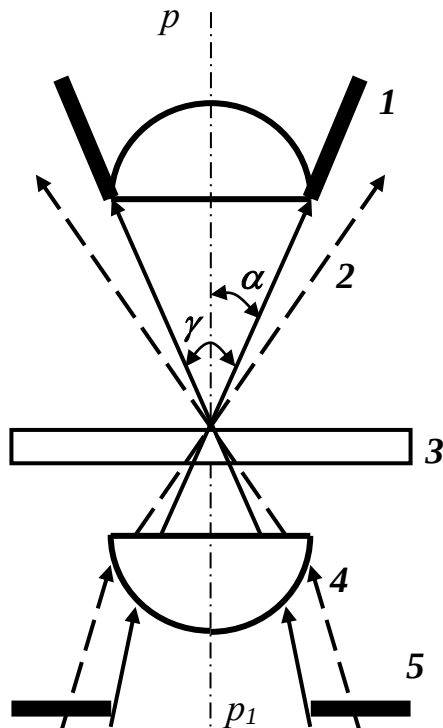
$$d = \lambda / 2 n \sin \alpha,$$

где: d – минимальное расстояние между двумя точками, видимыми раздельно;

λ – длина волны света, проходящего через исследуемый объект;

$n \sin \alpha$ – числовая апертура, где n – показатель преломления светом оптической среды, α – апертурный угол объектива.

На рис.2 представлена схема, иллюстрирующая понятие апертурного угла микроскопа (стрелками обозначен ход световых лучей).



- γ – отверстный угол;
- α – апертурный угол;
- 1 – фронтальная линза объектива;
- 2 – пространство между объектом и объективом;
- 3 – предметное стекло с объектом;
- 4 – конденсор;
- 5 – диафрагма;
- pp_1 – главная оптическая ось

Рис. 2 Схема, иллюстрирующая понятие апертурного угла

Э. Аббе доказал, что нет смысла беспредельно повышать увеличение светового микроскопа. Минимальное расстояние между двумя точками при освещении объекта светом с длиной волны 550 нм, к которому наиболее

чувствителен глаз, при использовании микроскопа, апертурный угол которого 90° (это предельный угол для которого $\sin\alpha=1$), для сухой системы составляет около 300 нм, а для иммерсионной системы – около 200 нм.

Таким образом, повысить разрешающую способность микроскопа можно путем:

- снижения длины волны света, проходящего через объект;
- использования иммерсионной системы;
- повышения апертурного угла до предельного (до 90°).
-

Микроскопия в темном поле

Используется для исследования слишком малых и слабоконтрастных живых объектов. При микроскопии этим методом используют специальный конденсор темного поля, центр которого затемнен. Поэтому центральный пучок световых лучей не попадает в объектив и поле зрения микроскопа остается темным. Объект освещается только лучами, попадающими на него под углом. Рассеиваясь на объекте, часть лучей изменяет направление и попадает на объектив. Объект становится видимым как светящаяся точка на темном фоне. Метод темного поля позволяет получить представление о внешней форме живых неокрашенных объектов и их движении.

Микроскопия в темном поле позволяет увеличить разрешающую способность объектива примерно в 10 раз и рассматривать объекты, размеры которых находятся за пределами обычного микроскопа. *Повышение разрешающей способности достигается за счет увеличения апертурного угла.*

Фазово-контрастная микроскопия

Дает возможность изучать живые объекты без окраски и фиксирования. Глаз человека реагирует на изменения амплитуды световой волны (интенсивность, контрастность) и ее длины (цвет), но не воспринимает различий по фазе. В биологических препаратах чередуются места, которые в разной степени поглощают свет. Проходя через них, световые волны изменяют свою амплитуду. Такие участки объекта называют амплитудными, и под микроскопом они выглядят более темными. Прозрачные в видимом свете структурные элементы объектов пропускают лучи одинаковой длины и амплитуды, но смещают их фазу. Величина смещения зависит от толщины и показателя преломления структур, но видимых изменений практически не дает. Такие препараты являются неконтрастными.

С помощью фазово-контрастного устройства фазовые изменения световых волн, проходящих через прозрачные объекты, превращаются в амплитудные, благодаря чему детали рассматриваемых объектов становятся видимыми и контрастными.

Фазово-контрастное устройство дает возможность изучать структуры клеток: жгутики и оболочки бактерий, ядра и митохондрии дрожжей и грибов.

Таким образом, *хотя разрешающая способность при использовании фазово-контрастной микроскопии не меняется при сравнении со*

светопольной, качество изображения улучшается за счет повышения контрастности.

Люминесцентная микроскопия

Люминесцентная микроскопия позволяет изучать клетки в живом виде, выявлять мембранные структуры и получать высококонтрастные цветные изображения микроорганизмов.

Сущность явления люминесценции заключается в том, что некоторые молекулы структурных элементов клетки (пигменты, витамины, алкалоиды и др.) способны поглощать часть энергии падающего света определенной длины волны, переходить в электронно-возбужденное состояние и испускать свет с другой длиной волны. Источником возбуждения могут быть ультрафиолетовые лучи (300-400 нм) и видимый свет коротковолновой области спектра (400-460 нм).

Клетки микроорганизмов обладают слабой собственной (первичной) люминесценцией. Ее можно усилить предварительным окрашиванием препаратов нетоксическими красителями – флуорохромами (акридин оранжевый, нейтральный красный, аурамин, флуоресцин и др.). В результате возникает вторичная люминесценция. Для ее возбуждения достаточно использовать сине-фиолетовую часть спектра. В результате возникает высококонтрастное цветное изображение рассматриваемого объекта.

Таким образом, *при использовании люминесцентной микроскопии разрешающая способность микроскопа возрастает по сравнению со светопольной микроскопией за счет уменьшения длины волны проходящего через объект света.*

Электронная микроскопия

Максимальная разрешающая способность оптических микроскопов составляет около 0,2 мкм и зависит от длины волны используемых лучей света. *Увеличить разрешение в 100 и более раз можно, если вместо световых или ультрафиолетовых лучей применять поток движущихся электронов, обладающих волновыми свойствами (длина волны около 0,04 нм).*

Поток электронов движется в безвоздушном пространстве от источника электронов (раскаленная нить вольфрамовой пушки) по направлению к флуоресцентному экрану и вызывает равномерное свечение его. Если же на пути электронов поместить какой-либо объект, то в зависимости от его плотности электроны будут больше или меньше задерживаться, а соответствующие места на экране окажутся более или менее затемненными. Этот простой принцип работы современного электронного микроскопа дополнен принципом отклонения электронных лучей в магнитном поле подобно тому, как световые лучи отклоняются увеличивающими стеклянными линзами. При этом используются электромагнитные линзы.

Высокая разрешающая способность современных электронных микроскопов позволяет наблюдать и изучать объекты, невидимые в оптических микроскопах: вирусы и фаги, микоплазмы, строение клеток прокариотов и эукариотов, их макро- и микроструктурные элементы. Препараты для электронной микроскопии готовят в виде очень тонких срезов на специальных

ультрамикротомах или на тончайших пленках – подложках из коллодия. Следовательно, в электронных микроскопах микроорганизмы исследуют не в живом состоянии, а в виде фиксированных препаратов.

2.2 ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

На занятии студенты знакомятся с устройством микроскопа и правилами работы с ним, видами микроскопии, основными особенностями их устройства и принципами их работы. Затем они осваивают технику отбора чистых культур микроорганизмов и методику приготовления фиксированных препаратов бактерий. Готовят фиксированные препараты из чистых культур (*Staphylococcus albus*, *Sarsina flava*) и естественных мест обитания (кефира, зубного налета). Далее окрашивают эти препараты простыми методами (чистые культуры и зубной налет – фуксином, а кефир – краской Муромцева) и рассматривают их с использованием иммерсионной системы с объективом $\times 90$ или $\times 100$ при максимальном освещении.

2.2.1 Техника отбора чистых культур микроорганизмов

Отбор проб чистых культур бактерий и дрожжей, которые вырастают на поверхности плотной среды в виде мажеобразного налета или в жидкой среде ведут в следующей последовательности:

1. Зажигают спиртовку.
2. Пробирку с культурой помещают в левую руку между большим и указательным пальцами в наклонном положении. Поверхность с налетом микроорганизмов должна быть обращена вверх и хорошо видна.
3. Петлю держат вертикально в пламени горелки и прокаливают докрасна, затем наклоняют и обжигают примыкающую к ней часть петледержателя.
4. Мизинцем и безымянным пальцем правой руки прижимают к ладони наружную часть ватной пробки, вынимают ее из пробирки и держа в таком положении, не касаясь окружающих предметов.
5. Края открытой пробки обжигают в пламени горелки.
6. Осторожно вводят стерильную петлю в пробирку с культурой и охлаждают ее о стенки пробирки или прикоснувшись к питательной среде, свободной от микроорганизмов. Немного отстранив пробирку с культурой от пламени горелки, легким движением осторожно отбирают небольшое количество микробной массы с поверхности среды или каплю жидкости с клетками. Вынимая петлю из пробирки, следят за тем, чтобы отобранный материал не касался стенок и петля не оказалась над пламенем горелки.
7. Снова обжигают в пламени горелки край пробирки, затем, легким круговым движением, обжигают ватно-марлевую пробку и закрывают пробирку.
8. Пробирку с культурой ставят в штатив, а извлеченный материал используют для приготовления препарата.
9. Клетки микроорганизмов, оставшиеся на петле, сжигают в пламени горелки.

Отбор чистых культур микроскопических грибов ведут с использованием препаровальной иглы в той же последовательности, что и отбор одноклеточных

организмов. Из пробирки отбирают кусочек мицелия, слегка погружая иглу в питательную среду таким образом, чтобы не нарушить структуру мицелия.

2.2.2 Приготовление препаратов фиксированных клеток

Фиксированными считают клетки микроорганизмов, в которых прерваны жизненные процессы, но полностью сохранена тонкая структура.

Для получения фиксированных препаратов важно правильно подготовить предметные стекла. Они должны быть чистыми и тщательно обезжиренными. Для этого стекла, бывшие в употреблении, выдерживают 1-2 часа в хромовой смеси (в 1 л воды вносят 50 г бихромата калия и 100 г технической серной кислоты), после чего ополаскивают теплой водой и спиртом. Можно также кипятить стекла в течение 15 мин. в растворе соды или мыльной воды. Для проверки чистоты стекла на его поверхность наносят каплю воды. При достаточном обезжиривании капля растекается равномерно и не собирается в выпуклые, медленно высыхающие пузырьки. Берут стекла пинцетом или аккуратно за грани, так как пальцы оставляют на поверхности жирные пятна.

Приготовление фиксированных препаратов ведут в следующей последовательности:

1. На середину чистого обезжиренного предметного стекла стерильной петлей наносят небольшую каплю воды. В нее вносят исследуемый материал, отобранный по методике, описанной в разделе 2.2.1. Полученную суспензию равномерно распределяют по поверхности стекла тонким слоем таким образом, чтобы препарат распределился на площади примерно 2...3 см².
2. Полученный мазок высушивают при комнатной температуре на воздухе.
3. Производят фиксацию мазка. Для этого стекло с высохшим мазком проводят 3-4 раза над пламенем горелки той стороной, где мазок отсутствует. Цель фиксации:
 - умертвить клетки микроорганизмов и сделать их безопасными (что особенно важно при работе с патогенными микроорганизмами);
 - зафиксировать (закрепить) мазок на стекле (чтобы они не смывались при окрашивании);
 - улучшить окрашивание, поскольку мертвые клетки лучше адсорбируют на своей поверхности различные красители.

Приготовление фиксированных препаратов из естественных мест обитания микроорганизмов проводится так же, как и из чистых культур.

Помимо термической обработки, применяют также фиксацию химическими веществами: погружают предметное стекло с мазком в мензурку с 96 %-ным этанолом на 15-20 мин, с ацетоном на 5 мин, со смесью 96 %-ного этанола и 40%-ного формалина (соотношение 95:5) на 2 мин. и др.

2.2.3 Окраска фиксированных препаратов микроорганизмов простыми методами

Фиксированные препараты нельзя рассмотреть под микроскопом, так как они являются бесцветными и пропускают световые лучи. Поэтому их окрашивают, используя простые или сложные методы.

При окрашивании фиксированных мазков простыми методами используют один краситель (фуксин, краска Муромцева, генцианвиолет, метиленовая синь и др.).

Последовательность окрашивания мазка простыми методами следующая:

1. На фиксированный препарат наносят несколько капель красителя таким образом, чтобы он покрывал всю поверхность мазка и выдерживают в течение определенного времени. Так, при окраске фуксином на мазок наносят несколько капель красителя и выдерживают его на мазке 2...3 мин. При окрашивании препарата из кефира на него краску Муромцева наносят на мазок через полоску фильтровальной бумаги на 3...5 мин.
2. Краску смывают с мазка слабой струей до бесцветной смывной воды. При этом стекло держат в наклонном положении над лотком.
3. Мазок подсушивают фильтровальной бумагой, которую осторожно прикладывают к стеклу, и досушивают на воздухе.
4. На окрашенный мазок наносят каплю иммерсионного масла и рассматривают препарат с объективом x90 или x100.

Оформление и анализ результатов исследований

В отчете студенты должны кратко законспектировать теоретических материал. Наблюдаемые под микроскопом картины нужно зарисовать и сделать заключение о морфологии исследованных чистых культур, а так же микрофлоры кефира и зубного налета. Под рисунками необходимо указать увеличение и подписать название изучаемого объекта.

Контрольные вопросы

1. Каково устройство биологического микроскопа?
2. Из каких частей и механизмов состоит механическая часть микроскопа?
3. Назовите основные характеристики микроскопа.
4. Что понимают под разрешающей способностью микроскопа? Как она определяется?
5. Что составляет оптическую систему микроскопа?
6. Объективы бывают сухие и иммерсионные. Что это значит?
7. Как определяется общее увеличение микроскопа?
8. Что входит в состав осветительной системы микроскопа?
9. Как следует настроить осветительную систему при работе с иммерсионным объективом?
10. Какие существуют правила работы с микроскопом?
11. Какие особенности устройства и принципы работы темнопольного, фазово-контрастного, люминесцентного и электронного микроскопов?
12. Чем определяется четкость получаемого изображения?
13. Перечислите основные правила работы с микроскопом.
14. Как проводится отбор проб чистой культуры микроорганизма?
15. Перечислите основные этапы приготовления фиксированного окрашенного препарата.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ БАКТЕРИЙ. СЛОЖНЫЕ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ БАКТЕРИЙ

Цель работы: Ознакомиться с морфологическим разнообразием бактерий и основными признаками, используемыми при их идентификации. Изучить различные сложные и дифференциальные методы окраски бактерий и их структур и разобраться в сущности этих методов и цели их использования. Освоить технику окраски бактерий по Граму и спор бактерий по Шефферу-Фултону.

Оборудование, материалы: Микроскоп; бактериологические петли; предметные стекла; спиртовка; иммерсионное масло; фильтровальная бумага; набор красок для окраски по Граму (фильтровальные бумажки с генцианвиолетом, растворы Люголя и фуксина рабочего) и окраски спор по Шефферу-Фултону (растворы бриллиантовой зелени и сафранина); 96 %-ный этиловый спирт; лоток с рельсами для предметных стекол; промывалка; чистые культуры бактерий: *Staphylococcus albus*; *Sarsina flava*; *Escherichia coli*; *Bacillus subtilis*.

КРАТКИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Основные признаки, используемые при идентификации микроорганизмов

Определение систематической принадлежности микроорганизмов – сложная задача, требующая длительных наблюдений, значительного количества специфических исследований и биохимических анализов.

При идентификации микроорганизмов учитывают:

- *морфолого-цитологические признаки.* К ним относятся строение, форма и размеры клеток, их взаимное расположение, тинкториальные свойства (особенности при окрашивании различными красителями), способность к образованию спор и капсул, подвижность, наличие жгутиков, образование в клетках некоторых включений, особенности размножения;
- *физиолого-биохимические признаки.* При изучении физиолого-биохимических признаков устанавливают отношение микроорганизмов к различным источникам углерода и азота, потребность в кислороде, температурные границы роста, солеустойчивость, чувствительность к антибиотикам, ферментативные тесты;
- *культуральные признаки.* К таким признакам относятся особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах.

При идентификации бактерий рекомендуется также учитывать дополнительные признаки: серологические свойства, фагоустойчивость, химический состав клеточных стенок, содержание отдельных нуклеотидов в

нуклеоиде (единственной хромосоме бактерий – молекуле ДНК, состоящей из двух спирально закрученных цепочек нуклеотидов, замкнутых в кольцо).

Чем больше у различных микроорганизмов общих признаков, тем ближе они находятся друг к другу по степени родства.

Основными признаками, позволяющими распределить микроорганизмы на группы, являются морфологические признаки, которые легко и достаточно быстро можно определить с помощью микроскопа.

Морфологические признаки бактерий

Бактерии объединяют обширную группу в основном одноклеточных микроорганизмов, разнообразную по форме, размерам и обмену веществ. Они являются прокариотными микроорганизмами.

При дифференциации бактерий путем микроскопии учитывают размеры и формы клеток, их взаимное расположение, химический состав и строение клеточных стенок, способность образовывать споры и капсулы, подвижность.

Основными формами бактерий, которые присутствуют в пищевом сырье, а также в продуктах растительного и животного происхождения, являются сферические бактерии (кокки) и палочковидные бактерии (палочки).

К основным морфологическим признакам кокков относятся их размеры (диаметр кокков в среднем составляет 1...2 мкм) и взаимное расположение. Взаимное расположение кокков определяется направлением образования перегородок при делении клеток. Если после деления клетки расходятся и располагаются поодиночке, то такие формы называются *монококками* или *микрочкокками*. Если при делении образуются скопления, напоминающие виноградные грозди, их относят к *стафилококкам*. Кокки, остающиеся после деления в одной плоскости связанными парами, называются *диплококками*, а образующие разной длины цепочки – *стрептококками*. Сочетания из четырех кокков, появляющиеся после деления клетки в двух взаимно перпендикулярных плоскостях представляют собой *тетракокки*. Если кокки делятся в трех взаимно перпендикулярных плоскостях, то они образуют скопления кубической формы – *сарцины*. Как выглядят различные скопления кокков под микроскопом изображено на рис. 3.

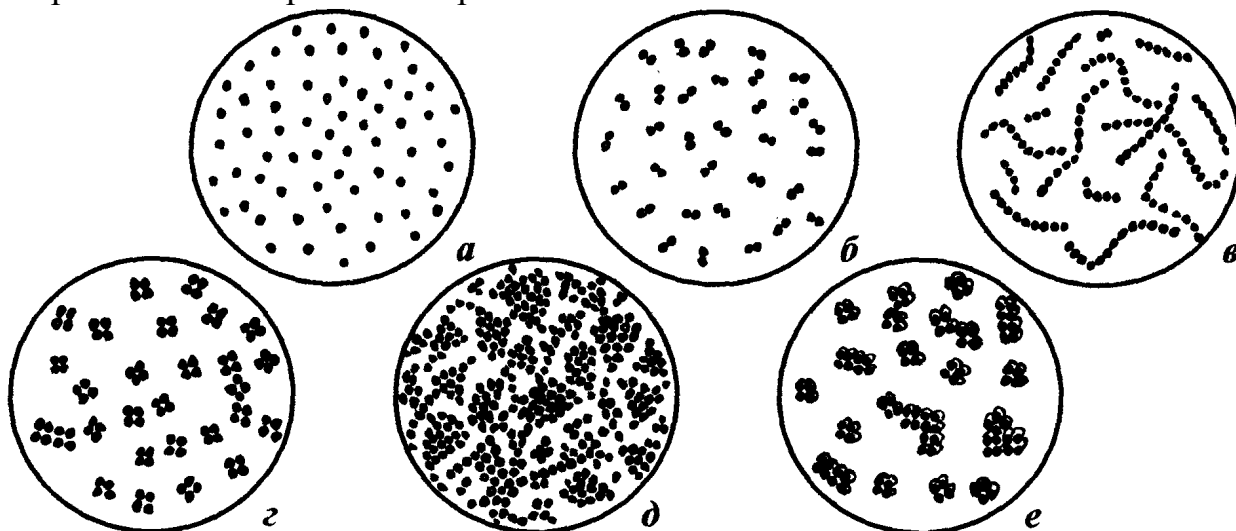


Рис. 3 Взаимные расположения кокков: а - микрококки; б - диплококки; в - стрептококки; г - тетракокки; д - стафилококки; е - сарцины

Основными морфологическими признаками палочковидных бактерий, которые определяются путем микроскопии, являются размеры палочек (средняя длина палочек – 2...7 мкм, диаметр в поперечнике - 0,5...1 мкм), взаимное расположение клеток, способность образовывать споры, подвижность.

Палочковидные бактерии могут располагаться поодиночке, попарно (*диплобактерии*) и цепочками (*стрептобактерии*).

При микроскопии легко можно определить спорообразующие и не спорообразующие формы палочковидных бактерий. Вегетативные клетки хорошо адсорбируют красители на своей поверхности и полностью окрашиваются. Оболочка споры малопроницаема, краски в них почти не проникают и под микроскопом споры имеют вид округлых или овальных блестящих зерен. Палочки, образующие споры называются *бациллами* и *кlostридиями*. У бацилл размер споры не превышает ширину клетки и поэтому при образовании споры форма клетки не меняется. У кlostридий диаметр споры больше толщины клетки и поэтому при созревании споры клетка приобретает форму веретена (если спора располагается в центре клетки) или барабанной палочки (если спора располагается на одном из полюсов клетки). На рис. 4 представлены морфологические разновидности палочковидных бактерий.

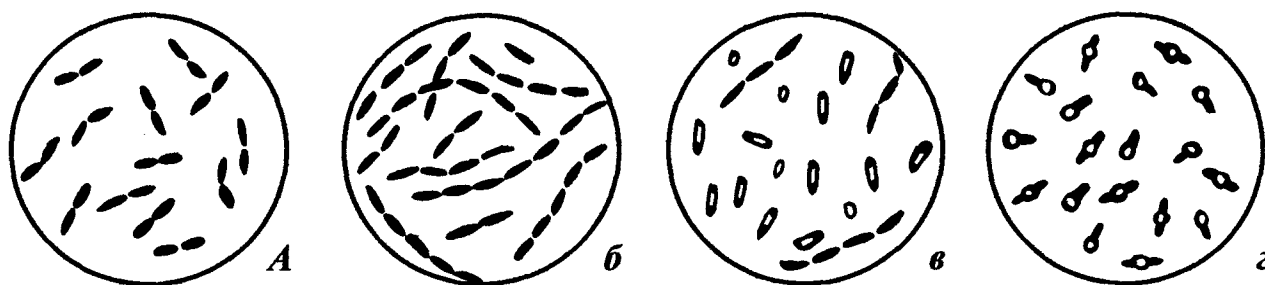


Рис. 4 Морфология палочковидных бактерий: а - диплобактерии; б - стрептобактерии; в - бациллы; г - кlostридии

При идентификации палочек диагностическое значение имеют также расположение спор в клетках бацилл и кlostридий, наличие и расположение жгутиков, способность образовывать капсулы.

3.2.3 Сложные и дифференциальные методы окраски бактерий

Различают простые, сложные и дифференциальные методы окраски бактерий. При простой окраске используют один краситель и прокрашивают всю клетку. *Сложное окрашивание* предусматривает применение двух или нескольких красителей (например, при определении отношения бактерий к окраске по Граму). *Дифференциальное окрашивание* основано на индивидуальном отношении биологических структур клетки к различным

красителям (окраска спор, оболочки, капсул, метакроматина и др.). При этом так же, как и в сложных методах, как правило, используется несколько красителей.

Сложные методы окраски позволяют распределить бактерии на группы, что имеет важное диагностическое значение при их идентификации. Среди сложных методов наиболее широкое применение нашел метод окраски бактерий по Граму, позволяющий разделить бактерии в зависимости от химического состава и структуры клеточной стенки на две основные группы - грамположительные (грам+; G^+) и грамотрицательные (грам-; G^-). Грамположительные бактерии по этому методу окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, а грамотрицательные – в розовый. К сложным методам относится и метод окраски по Циллю-Нильсену, позволяющий дифференцировать бактерии на две группы по кислотоустойчивости. Этот метод позволяет выявить туберкулезную палочку, бактерии паратуберкулезного энтерита крупного рогатого скота и другие кислотоустойчивые микроорганизмы.

При использовании *дифференциальных (специальных) методов* можно окрасить споры, определить наличие в клетках запасных питательных веществ, выявить клеточные структуры.

При окраске спор, например, можно использовать различные методы (методы Шеффера-Фултона, Пешкова, Златогорова, Меллера и др.), основанные на разрыхлении малопроницаемой для красителей оболочки спор различными способами (путем нагревания, обработки препарата кислотами, щелочами) с одновременным или дальнейшим их окрашиванием концентрированным красителем. После такой обработки препарат промывают водой (при этом клетки обесцвечиваются, а споры остаются окрашенными) и докрашивают вегетативные клетки красителем контрастного цвета.

Большое значение с диагностической точки зрения имеет окрашивание капсул. Капсульные вещества слабо окрашиваются и при простом методе окраски выступает в виде бледной каймы бесцветного или слабоокрашенного ореола вокруг микробной клетки. Для того чтобы лучше рассмотреть капсулы, используют методы Михина, Муромцева, Ольта, Бурри-Гинса и др. В этих методах используют один или несколько красителей. Так, для окраски капсул по Бурри-Гинсу, суспензию слизеобразующих бактерий смешивают на краю предметного стекла с каплей туши и с помощью другого предметного стекла распределяют тонким слоем по поверхности. Далее препарат фиксируют над пламенем горелки и окрашивают фуксином или сафранином. При микроскопии такого препарата на темном фоне отчетливо выделяются окрашенные в красный цвет бактерии, окруженные бесцветными капсулами.

С другими специальными методами, позволяющими определить наличие и содержание запасных веществ в клетках (определение гликогена и волютина), студенты ознакомятся при исследовании качества производственных дрожжей (лабораторная работа №6).

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

На занятии студенты знакомятся с основными признаками, которые учитываются при идентификации микроорганизмов, обращают внимание на морфологические признаки кокков и палочек, диагностическое значение сложных и дифференциальных методов окраски бактерий. Осваивают технику окраски бактерий по методу Грама. Определяют, какие из представленных для исследования бактерии относятся к грамположительным, а какие к грамотрицательным. Готовят фиксированный мазок из чистой культуры спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* и окрашивают его по Шефферу-Фултону.

3.2.1 Окраска бактерий по методу Грама

Сущность метода заключается в различии химического состава и строения клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Клеточная стенка грам+ бактерий толстая, но однослойная, содержит много пептидогликана – *муреина*, а также *тейховые кислоты*, которые образуют прочное соединение с красителями - генцианвиолетом и йодом и поэтому остаются окрашенными после обработки мазка спиртом. Таким образом, грам+ бактерии по методу Грама окрашиваются в сине-фиолетовый цвет.

У грам – бактерий клеточная стенка тонкая, но двухслойная. Муреина мало, причем он содержится во внутреннем слое клеточной стенки, тейхоевые кислоты отсутствуют. Внешний слой клеточной стенки содержит, главным образом, вещества, обладающие гидрофобными свойствами – *липополисахариды* и *липопротеиды*. Эти вещества не образуют прочного комплекса с красками генцианвиолетом и йодом и поэтому клетки обесцвечиваются после обработки 96 %-ным этиловым спиртом и после дополнительной окраски красителем фуксином окрашиваются в бледно-розовый цвет.

Техника окраски по Граму

1. На предметном стекле готовят фиксированный мазок исследуемой чистой культуры;
2. Мазок окрашивают красителем генцианвиолетом через полоску фильтровальной бумаги. Можно также использовать заранее приготовленные фильтровальные бумажки, смоченные 1 %-ным спиртовым раствором кристаллвиолета и высушенные (метод Грама в модификации А.В. Синева). В этом случае бумажки помещают на фиксированный мазок и смачивают несколькими каплями воды. Окраску препарата проводят в течение 2...3 мин;
3. Фильтровальную бумагу снимают с мазка, краску сливают и наносят на мазок раствор Люголя на 2 мин;

4. Раствор Люголя сливают с мазка и обрабатывают 96 %-ным спиртом в течение 30...60 сек. Затем препарат промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой;
5. Мазок окрашивают красителем фуксином 2...3 мин, второй раз промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой.

Затем на стекло наносят каплю иммерсионного масла и рассматривают препарат с объективом х90 или х100 при максимальном освещении.

3.2.2 Окраска спор бактерий по Шефферу-Фултону

Сущность метода заключается в комбинированном действии концентрированного раствора красителя бриллиантового зеленого и температуры на малопроницаемую оболочку спор с дальнейшим обесцвечиванием цитоплазмы вегетативной клетки и ее контрастным докрашиванием сафранином. Таким образом, споры окрашиваются в зеленый цвет, а клетки – в красный.

Техника окраски по Шефферу-Фултону

1. На краю предметного стекла (на расстоянии примерно 1,5-2,0 см от края) готовят густой нефиксированный мазок из чистой культуры спорообразующих бактерий;
2. На раствор наносят водный раствор бриллиантовой зелени, и мазок с краской нагревают над пламенем горелки до появления пара. Нельзя допускать прикипания краски к мазку. Поэтому препарат периодически отстраняют от пламени. Нагревание мазка с краской проводят в течение 3 мин;
3. Краску сливают, препарат быстро промывают водой и просушивают фильтровальной бумагой;
4. Окрашивают мазок раствором сафранина 2...3 мин, затем краску сливают, мазок вторично промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой.

Далее на мазок наносят каплю иммерсионного масла и рассматривают под объективом на х90 или х100 при максимальном освещении.

Оформление и анализ результатов исследований

В отчете студенты кратко конспектируют теоретический материал и переписывают сущность и технику окраски бактерий по Граму и спор бактерий по Шефферу-Фултону. Зарисовывают микроскопические картины исследованных чистых культур бактерий с учетом морфологических особенностей каждого микроорганизма. Под каждым рисунком подписывают латинское название микроорганизма, отношение его к окраске по Граму, увеличение исследованного объекта.

Контрольные вопросы

1. *Какие признаки учитывают при идентификации микроорганизмов. Какие признаки являются основными при дифференциации бактерий?*
2. *Как провести дифференциацию кокковых форм бактерий по их взаимному расположению?*

3. *Каким образом можно провести дифференциацию палочковидных бактерий по их внешнему виду?*
4. *Каково назначение сложных методов окраски бактерий? Какие сложные методы окраски бактерий Вам известны?*
5. *Для чего используются дифференциальные (специальные) методы окраски бактерий? Привести примеры.*
6. *В чем заключается сущность метода окраски бактерий по Граму?*
7. *Каким образом проводят окрашивание фиксированных препаратов бактерий по методу Грама?*
8. *В чем заключается сущность метода окрашивания бактериальных спор по Шефферу-Фултону?*
9. *Какова техника окраски спор бактерий по методу Шеффера-Фултона?*
10. *Какими методами можно выявить капсулы у бактерий? Как осуществляют окраску капсул по Бурри-Гинсу?*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №4

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ПРИЗНАКОВ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ И ДРОЖЖЕЙ. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ «РАЗДАВЛЕННАЯ КАПЛЯ»

Цель работы: Ознакомиться с морфологическими особенностями грибов и дрожжей, встречающихся при производстве пищевых продуктов. Освоить технику микроскопического исследования грибов и дрожжей в препаратах «раздавленная капля».

Оборудование, материалы: Микроскоп; препаровальные иглы и бактериологические петли; предметные и покровные стекла; фильтровальная бумага; спиртовка; лоток с рельсами для предметных стекол; культуры грибов родов *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*; чистая культура дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

КРАТКИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Морфология и культуральные признаки микроскопических грибов

Микроскопические грибы относятся к надцарству эукариот, царству грибов, отделу истинных грибов и являются представителями трех из четырех классов: фикомицетов, аскомицетов и дейтеромицетов. Представители царства грибов являются аэробными микроорганизмами и по типу питания относятся к хемоорганогетотрофам. Большинство грибов – сапрофиты, но некоторые вызывают заболевания и являются паразитами.

Вегетативное тело грибов называется *мицелием*. Мицелий состоит из множества переплетающихся нитей-трубочек, называемых *гифами*. Диаметр гифов, колеблется от 5 до 50 мкм. В зависимости от строения мицелия грибы

делятся на высшие и низшие. У высших грибов гифы разделены перегородками (септами) в центре которых имеется большая пора. В класс фикомицетов объединяются низшие грибы, представители классов аскомицетов и дейтеромицетов являются высшими грибами.

Грибы – это *циноцитные* микроорганизмы. Это значит, что они растут и при этом происходят деления ядер, но не происходит клеточных делений. Таким образом, вегетативное тело гриба представляет собой одну большую многоядерную клетку.

Все микроскопические грибы могут размножаться вегетативно кусочком мицелия.

При бесполом размножении у фикомицетов образуются *спорангиеносцы*, а у аскомицетов – *конидиеносцы*. Дейтеромицеты могут размножаться *многоклеточными конидиями*.

Фикомицеты и аскомицеты являются *совершенными грибами*. Это значит, что представители этих классов могут размножаться половым путем. Дейтеромицеты относятся к *несовершенным грибам*.

Культуральные признаки микроскопических грибов

Колонии микроскопических грибов по размерам во много раз превосходят колонии одноклеточных организмов (бактерий, грибов) и нередко разрастаются по всей поверхности питательной среды в чашках Петри. Консистенция грибных колоний различная. Чаще образуются войлокообразные и кожистые колонии, реже крошковатые. Поверхность колоний может быть пушистой, как вата, бархатистой, мучнистой, паутинообразной, нитевидной, кожистой или гладкой. При росте на плотных и жидких средах часть гифов врастает в питательную среду, образуя *субстратный* мицелий, а другая часть гифов образует *воздушный* мицелий в виде пушистого налета, видимого невооруженным глазом. Мицелий может быть также бесцветным (белым, сероватым) или окрашенным (черным, бурым, зеленым, желтым и т.д.). Пигментирован только плодоносящий мицелий.

Характеристика микроскопических грибов различных классов

Морфологические особенности грибов различных классов представлены на рис. 5.

Род ***Mucor*** относится к классу фикомицетов. Эти грибы имеют неспитированный мицелий. Они могут размножаться бесполом и половым путем с образованием спорангиеносцев (рис. 5). Снаружи спорангий покрыт тонкими шипами из кристаллов щавелевокислого кальция. При созревании спорангий разрывается, спорангиеспоры высвобождаются и разносятся воздушными потоками. На спорангиеносце после освобождения спорангия от спор остается колонка, а в нижней ее части – воротник. Цвет мицелия муковых грибов вначале белый, затем серовато-оливковый, вид – войлокоподобный.

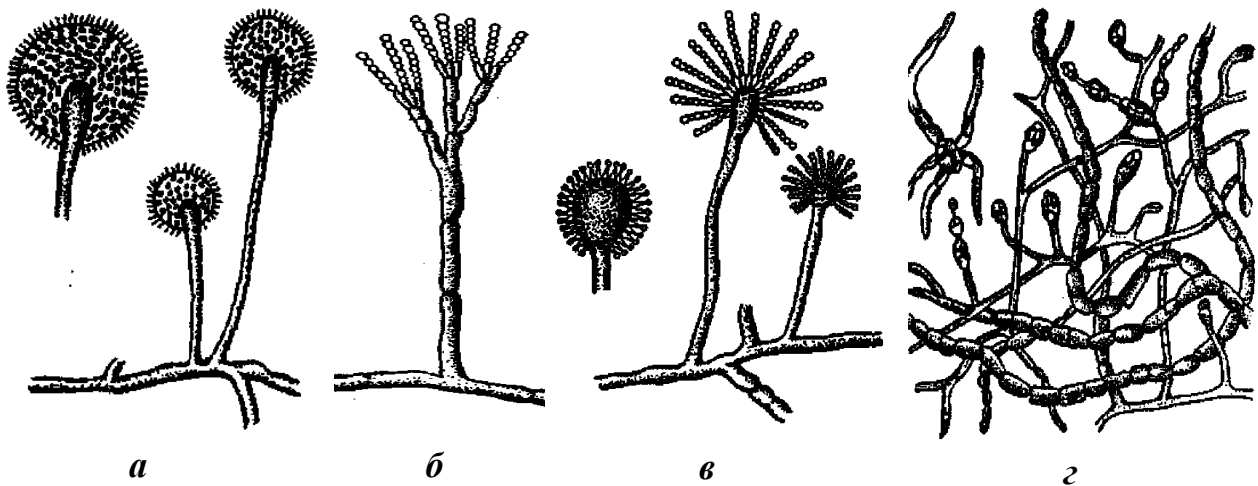


Рис. 5 Морфологические особенности грибов различных классов:
а - *Mucor*; б - *Penicillium*; в - *Aspergillus*; г - *Alternaria*

Мукоровые грибы растут на поверхности влажного зерна, солода, корнеплодов, на пищевых продуктах, на стенах сырых помещений в виде сероватого пушистого налета. *Mucor nigricans* является возбудителем кагатной гнили сахарной свеклы. Многие мукоровые грибы используются в промышленности для производства различных органических кислот и спирта (грибы видов *Mucor javanicus*, *Mucor racemosus*), ферментных препаратов, каротиноидов, стероидов.

Представители родов *Aspergillus* и *Penicillium* относятся к классу аскомицетов, который объединяет высшие микроскопические совершенные грибы. При бесполом размножении с помощью спор эти грибы образуют конидиеносцы (рис. 5). Аспергиллы и пенициллы относятся к плодосумчатым грибам. Это значит что при половом размножении у них на специальных плодовых телах образуются аски (сумки), в которых находятся 8 аскоспор.

К роду *Penicillium* относится около половины всех плесневых грибов. Они широко распространены в почве, в воздухе плохо проветриваемых помещений и вызывают порчу различных продуктов и материалов. Этот гриб имеет ветвящийся септированный мицелий (диаметр гифов – 2...3 мкм) и септированные конидиеносцы (напоминают кисточки), которые на конце разветвляются в виде отростков – стеригм. От них отходят конидии, состоящие из цепочек спор. В зависимости от вида конидии могут быть разного цвета (белые, зеленые и др.). Многие пенициллы используются в промышленности для получения различных ценных продуктов. Среди выделенных штаммов этого рода 25 % обладают антибиотической активностью, а такие виды как *Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum* используются как продуценты пенициллина. Некоторые виды пенициллов используются как продуценты ферментов и липидов. В производстве мягких сыров рокфор и камамбер используются благородные плесени *Penicillium roqueforti* и *Penicillium camamberti*.

Грибы рода *Aspergillus* насчитывают более 200 видов. Эти грибы имеют хорошо развитый ветвящийся мицелий с многочисленными септами. Конидиеносцы несептированы, верхние их концы грушевидно или шаровидно

расширены в виде небольшой головки. На головке располагаются кеглеобразные стеригмы с цепочками конидий, которые напоминают струйки воды, выливающиеся из лейки. Отсюда возникло название «лещная плесень» (*aspergere* по латыни – поливать, опрыскивать). Конидии аспергиллов при созревании приобретают различную окраску, что наряду с другими признаками определяет их видовую принадлежность.

Так же как и пенициллы, представители рода *Aspergillus* широко распространены в природе и играют важную роль в минерализации органических веществ. Они вызывают плесневение многих пищевых продуктов. Эти грибы являются продуцентами многих ценных веществ и широко используются в промышленности. Так, *Aspergillus niger*, применяют в промышленности для производства лимонной кислоты; *Aspergillus terreus* – итаконовой кислоты *Aspergillus flavus* и *Aspergillus terricola* образуют наиболее активный комплекс протеолитических ферментов; *Aspergillus oryzae* и *Aspergillus awamori* являются лучшими продуцентами амилалитических ферментов.

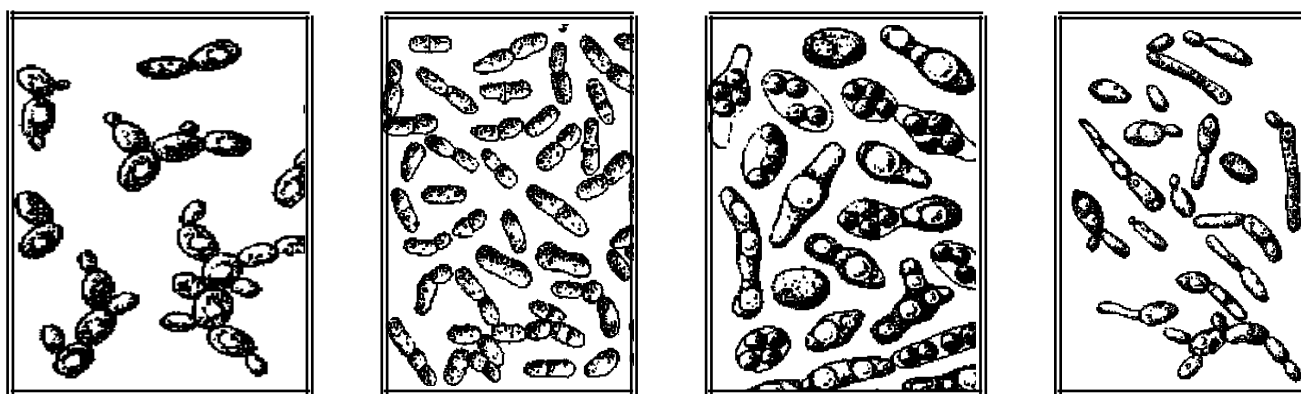
Грибы рода *Alternaria* относятся к классу несовершенных грибов – дейтеромицетов. Это высшие грибы. Они имеют септированный мицелий и короткие несептированные конидиеносцы, на которых находятся многоклеточные конидии грушевидной или лимоновидной формы (рис. 5). Гриб является возбудителем черной гнили – болезни корнеплодов и плодов, а также возбудителем порчи пищевых продуктов.

Морфология дрожжей и их характеристика

Дрожжи – это высшие одноклеточные грибы. Большинство дрожжей относится к двум классам грибов – аскомицетам и дейтеромицетам.

Дрожжи по отношению к кислороду делятся на факультативные анаэробы (в аэробных условиях осуществляют дыхание и активно накапливают биомассу, а в анаэробных условиях вызывают спиртовое брожение) и аэробы.

Морфологически дрожжи разнообразны. Они отличаются друг от друга размерами и формой клеток. Размеры клеток дрожжей в зависимости от вида варьируют в следующих пределах; от 2,5 до 10 мкм в поперечнике и от 4 до 20 мкм в длину. Морфологическое разнообразие форм дрожжей изображено на рис. 6.



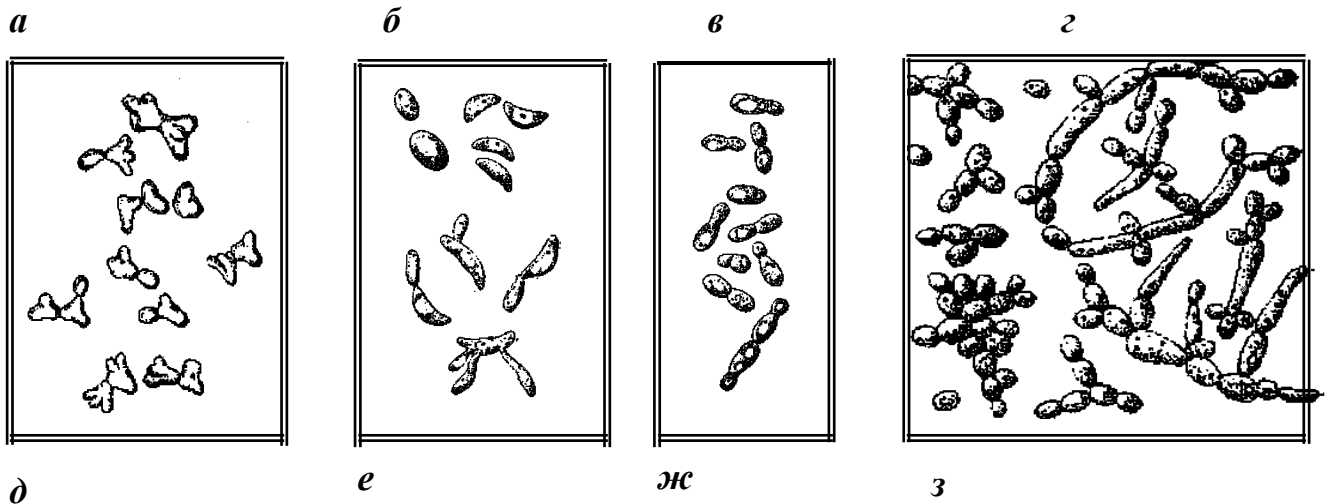


Рис. 6 Формы дрожжевых клеток: а - овальная яйцевидная; б - цилиндрическая; в - апикулятная; лимоновидная; г - стреловидная; д - треугольная; е - серповидная; ж - колбовидная; з, и - мицелиевидная

Форма и размеры дрожжевых клеток зависят от вида, возраста, питательной среды, способа культивирования.

В зависимости от вида дрожжи вегетативно могут размножаться почкованием (так размножаются дрожжи овальной формы), бинарным делением (характерно для дрожжей цилиндрической или палочковидной формы) или почкующимся делением. Кроме вегетативного размножения, дрожжи – аскомицеты могут размножаться половым путем с образованием аскоспор.

Из дрожжей, относящихся к классу аскомицетов, большое значение имеют дрожжи-сахаромицеты рода *Saccharomyces*, которые широко используются в пищевой промышленности. Главным биохимическим признаком этих дрожжей является то, что они сбраживают сахара с образованием этилового спирта и диоксида углерода. Дрожжи, используемые в промышленности, называются *культурными дрожжами*. Так, в хлебопекарном производстве и в производстве спирта используются верховые дрожжи рода *Saccharomyces cerevisiae*. Дрожжи вида *Saccharomyces minor* нашли применение в производстве ржаного хлеба и кваса. В пивоварении используются низовые дрожжи *Saccharomyces carlsbergensis*. Дрожжи-сахаромицеты имеют овальную форму, вегетативно размножаются почкованием, в неблагоприятных условиях размножаются половым путем аскоспорами.

Некоторые спорогенные дрожжи являются *дикими дрожжами*. Эти дрожжи так же, как и культурные, способны осуществлять спиртовое брожение, но помимо спирта образуют много побочных продуктов (таких как альдегиды, высшие спирты, эфиры и др.) и поэтому ухудшают органолептические показатели продукта. Эти дрожжи являются вредителями производства различных напитков (пива, вина, безалкогольных напитков), а также возбудителями порчи многих пищевых продуктов.

Дрожжи - дейтеромицеты могут размножаться только вегетативным способом. Некоторые из этих дрожжей (например, дрожжи рода *Candida*)

используются в промышленности для получения кормового белка, органических кислот, витаминов и других продуктов микробного синтеза. Дрожжи вида *Torulopsis kefir* входят в состав симбиотической закваски – кефирного грибка. Другие представители несовершенных (аспорогенных) дрожжей являются дикими дрожжами и вызывают порчу многих пищевых продуктов. К дрожжам- вредителям производства относятся дрожжи родов *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Torula*, *Torulopsis*, *Mycoderma*, *Trichosporon* и др. Среди аспорогенных дрожжей встречаются *ложные дрожжи*, которые образуют псевдомицелий и растут на жидких субстратах в виде пленок.

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

На занятии студенты изучают морфологические признаки грибов и дрожжей, их культуральные свойства, знакомятся с представителями отдельных классов. Осваивают методику приготовления препаратов «раздавленная капля» и технику микроскопирования живых неокрашенных объектов.

Приготовление препаратов типа «раздавленная капля»

1. На предметное стекло трубочкой или пипеткой наносят большую каплю воды или этилового спирта;
2. Зажигают спиртовку, прокалывают препаровальную иглу над пламенем горелки и отбирают небольшое количество мицелия из пробирки или чашки Петри, соблюдая правила асептики (см. раздел 2.1.1);
3. Мицелий аккуратно помещают в каплю, нанесенную на предметное стекло и с помощью двух игл расправляют его в воде;
4. Препарат накрывают покровным стеклом и слегка придавливают. Излишки воды удаляют с помощью фильтровальной бумаги.
5. Микроскопируют препарат «раздавленная капля» сначала с объективом х8, а затем х40 в затемненном поле зрения (конденсор опущен, шторка ирис-диафрагмы прикрыта).

При отборе и микроскопии препаратов грибов учитывают следующие рекомендации:

- а) *гриб рода Mucor*. Отбирают черновато-серый пушистый воздушный мицелий. При микроскопии обращают внимание на гифы с заполненными спорами спорангиями и колонки, которые образуются при освобождении спорангия;
- б) *гриб рода Aspergillus*. Отбирают немного пушистого мицелия с окрашенными конидиями, слегка углубляясь иглой в питательную среду. Обращают внимание на несептированные конидиеносцы;
- в) *гриб рода Penicillium*. При отборе стараются взять молодой мицелий (на границе окрашенного и белого мицелия), углубляясь иглой в среду. Обращают внимание на септированные гифы с кисточками.

г) *гриб рода Alternaria*. Берут грибницу в черных участках, углубляясь в нее иглами. Обращают внимание на септированный мицелий, слабо развитые конидиеносцы и крупные конидии, имеющие вид округлых или заостренных многоклеточных образований, напоминающих «гранаты-лимонки».

При исследовании дрожжей на предметное стекло наносят суспензию дрожжей, накрывают покровным стеклом, излишки воды удаляют фильтровальной бумагой. Микроскопируют препарат и объективом х8 и х40.

Оформление и анализ результатов исследований

В отчете студенты кратко конспектируют теоретический материал. Зарисовывают микроскопические картины исследованных культур грибов и дрожжей с учетом морфологических особенностей каждого микроорганизма. Под каждым рисунком подписывают латинское название и увеличение препарата. Описывают культуральные свойства изучаемых грибов.

Контрольные вопросы

1. Как готовятся препараты микроскопических грибов и дрожжей?
2. Охарактеризуйте морфологические и культуральные свойства микроскопических грибов.
3. Какие грибы используются в промышленности для получения органических кислот, ферментов, антибиотиков и других ценных продуктов?
4. Охарактеризуйте морфологические свойства дрожжей.
5. Что такое культурные дрожжи? В каких отраслях пищевой промышленности они используются?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ. ПОЛУЧЕНИЕ ЧИСТЫХ И НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ. ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ И МОРФОЛОГИИ ВЫДЕЛЕННЫХ КУЛЬТУР (выполняется на 2-х занятиях)

Цель работы: Ознакомиться с методами получения накопительных и чистых культур микроорганизмов. Освоить технику посева микроорганизмов на плотные и жидкие питательные среды и методики выделения чистых и накопительных культур из различных объектов окружающей среды. Научиться описывать культуральные свойства микроорганизмов.

Оборудование и материалы: Спиртовка; бактериологическая петля и препаровальная игла; пробирки со свежеприготовленным скошенным мясопептонным агаром (МПА); чашки Петри с МПА; пробирки со стерильным обезжиренным молоком с добавлением 5 % этилового спирта; сырое молоко; гниущее мясо; бактериальная смесь №1 (состоящая, например, из чистых культур стафилококка и кишечной палочки) и бактериальная смесь №2

(состоящая из чистых культур бактерий рода *Bacillus* и бактерий, не образующих спор); микроскоп; иммерсионное масло; фильтровальная бумага; набор красок для окраски по Граму (фильтровальные бумажки с генцианвиолетом, растворы Люголя и фуксина рабочего); 96 %-ный этиловый спирт: лоток с рельсами для предметных стекол; промывалка;

КРАТКИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Понятие о чистой и накопительной культуре микроорганизмов

Культивирование – выращивание микроорганизмов на питательных средах. При культивировании на питательных средах вырастают *культуры* микроорганизмов. *Рост культуры* – физиологический процесс, в результате которого увеличивается *биомасса* – масса клеточного вещества данного микроорганизма.

Чистой культурой микроорганизма называют культуру микроорганизмов одного вида, представленную потомством одной клетки. Для выделения чистой культуры используют, как правило, плотные питательные среды, на которых каждая клетка вырастает в виде *изолированной колонии* – потомства микроорганизмов, образовавшееся из одной клетки.

Выделение чистой культуры микроба является основой бактериологической работы, так как чаще всего исследуемый материал содержит смесь различных видов микробов. Чистые культуры нужны для изучения свойств микроорганизмов и установления их видовой принадлежности. Кроме того, чистые культуры микроорганизмов (дрожжей, микроскопических грибов, молочнокислых, уксуснокислых, пропионовокислых и других бактерий) обладают промышленно ценными свойствами и нужны для получения различных продуктов и веществ, нашедших применение в пищевой промышленности и других отраслях народного хозяйства.

Перед выделением чистой культуры из различных объектов окружающей среды (пищевого продукта, с поверхности плодов и овощей, из почвы, воды и др.), в которых находится множество микроорганизмов, вначале получают накопительные культуры, проводя культивирование в *элективных условиях* – условиях, способствующих развитию одной культуры и ограничивающих развитие сопутствующих микроорганизмов. Обеспечить элективные условия для микроорганизмов можно только в том случае, если известны особенности обмена веществ выделяемого микроорганизма. Так как различные микроорганизмы используют различные источники питания, то элективные условия легче всего обеспечить, подбирая определенный состав питательных сред. Можно создать элективные условия, обеспечивая соответствующую температуру, рН, освещение и др.

Накопительные культуры состоят преимущественно из клеток микроорганизмов одного вида. Для получения накопительных культур используют жидкие накопительные питательные среды, различные методы

обработки материала, содержащего смесь микробов, а также учитывают другие особенности выделяемых из объекта микроорганизмов.

Для выделения чистых и накопительных культур из различных объектов в лабораториях используют методы посева и пересева. *Посевом* называется внесение части исследуемого материала в стерильную питательную среду, *пересевом* – перенос части выросшей на питательной среде культуры микроорганизмов на другую свежую питательную среду.

5.1.2 Методы выделения накопительных культур микроорганизмов

К таким методам относятся методы обогащения, метод нагревания исследуемого материала для выделения спорообразующих бактерий, метод выделения подвижных форм бактерий (метод Шукевича) и др.

Методы обогащения

Их часто применяют для выделения чистых культур микроорганизмов (например, бактерий группы кишечной палочки (БГКП), сальмонелл и др.) из материалов, в которых мало выделяемых микроорганизмов, но содержится большое количество сопутствующей микрофлоры. Для увеличения численности выделяемого вида микроорганизмов вначале делают посев исследуемого материала в накопительные питательные среды, которые содержат вещества, стимулирующие его рост и угнетающие или задерживающие размножение сопутствующей микрофлоры. Например, для выделения сальмонелл проводят посев в среды обогащения Кауфмана, Мюллера и др., для выделения БГКП – на среду Кесслера. При выделении культур молочнокислых бактерий из почвы, сырого молока или растений посеvy делают на стерильное обезжиренное молоко, содержащее 5 % этилового спирта для подавления роста гнилостных бактерий.

Метод нагревания

Применяют для выделения чистых культур споровых форм бактерий (бацилл, клостридий). В этом случае перед посевом исследуемый материал прогревают на водяной бане при температуре 75...85 °С в течение 20...30 мин. Вегетативные формы погибают во время прогревания, а споры микробов остаются живыми и при последующих высевках на плотную среду прорастают, формируя колонии.

Метод выделения подвижных форм бактерий (метод Шукевича)

Заключается в посеве исследуемого материала в конденсационную воду скошенного мясопептонного агара. При размножении подвижные формы микроорганизмов из конденсационной воды распространяются на агаре, как бы вползая на его поверхность.

Методы выделения анаэробных микроорганизмов

Основаны на выращивании микроорганизмов в средах с низкой концентрацией кислорода или в безкислородной среде, что достигается:

- посевом исследуемого материала в среды, содержащие редуцирующие и легко окисляемые вещества (антиоксиданты). В качестве таких веществ

чаще всего используют тиогликолят натрия, солянокислый цистеин, кусочки животных и растительных тканей;

- посевом исследуемого материала в глубину плотных питательных сред. Посев делается уколом препаровальной иглой в пробирку со столбиком плотной среды или в расплавленную плотную или полужидкую питательную среду с последующим перемешиванием;
- механическим удалением воздуха из сосудов при выращивании анаэробных микроорганизмов (создают вакуум);
- культивированием анаэробных микроорганизмов в жидких средах под слоем масла;
- культивированием анаэробных микроорганизмов в атмосфере инертного газа, диоксида углерода, азота.

5.1.3 Методы выделения чистых культур микроорганизмов

Метод Пастера (метод предельных разведений)

Заключается в том, что из исследуемого материала делают ряд последовательных разведений в жидкой питательной среде. Для этого каплю посевного материала вносят в пробирку со стерильной жидкой средой, из нее каплю переносят в следующую пробирку и так засевают до 8...10 пробирок. С каждым разведением количество микробных клеток, попадающих в среду, будет уменьшаться и можно получить такое разведение, в котором во всей пробирке со средой будет находиться только одна микробная клетка, из которой разовьется чистая культура микроорганизма. Так как в жидких средах микробы растут диффузно, т.е. легко распределяются во всей среде, то изолировать одну микробную клетку от другой трудно. Таким образом, метод Пастера не всегда обеспечивает получение чистой культуры. Поэтому в настоящее время этот метод используется, главным образом, для предварительного уменьшения концентрации микроорганизмов в материале перед посевом его в плотную среду для получения изолированных колоний.

Методы механического разделения микроорганизмов с использованием плотных питательных сред

К таким методам относятся метод Коха и метод Дригальского.

Метод Коха (метод глубинного посева)

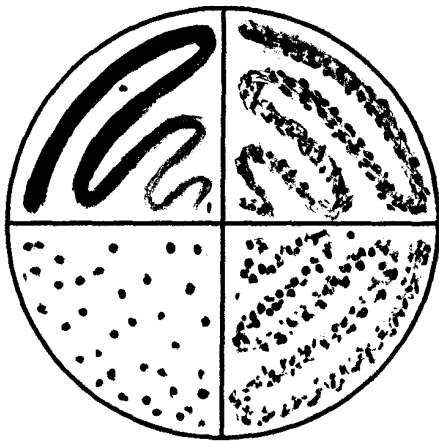
Исследуемый материал вносят бактериологической петлей или пастеровской пипеткой в пробирку с расплавленной плотной питательной средой. Равномерно размешивают содержимое пробирки, вращая ее между ладонями. Каплю разведенного материала переносят во вторую пробирку, из второй – в третью и т.д. Содержимое каждой пробирки, начиная с первой, выливают в стерильные чашки Петри. После застывания среды в чашках, их помещают в термостат для культивирования.

Для выделения анаэробных микроорганизмов по методу Коха необходимо ограничить доступ кислорода к культуре. С этой целью поверхность глубинного посева в чашке Петри заливают стерильной смесью парафина и

вазелина (1:1). Можно также оставлять посевной материал, тщательно перемешанный с агаризованной средой, непосредственно в пробирке. Ватную пробку при этом заменяют резиновой или заливают поверхность агара смесью парафина и вазелинового масла. Чтобы извлечь выросшие колонии анаэробных микроорганизмов, пробирки слегка нагревают, быстро вращая над пламенем горелки. Агар, прилегающий к стенкам, расплавляется, и столбик легко выскальзывает в подготовленную чашку Петри. Далее столбик с агаром разрезают стерильным скальпелем, колонии извлекают стерильной петлей или стерильной капиллярной рубкой и переносят в жидкую среду.

Метод Дригальского основан на механическом разделении микробных клеток на поверхности плотной питательной среды в чашках Петри. Каждая микробная клетка, фиксируясь в определенном месте, начинает размножаться, образуя колонию.

Для посева по методу Дригальского используют несколько чашек Петри, залитых плотной питательной средой. На поверхность среды вносят каплю исследуемого материала. Затем с помощью стерильного шпателя эту каплю распределяют по всей питательной среде (посев газоном).



Посев также можно проводить штрихом, используя бактериологическую петлю. Этим же шпателью или петлей осуществляют посев во вторую, третью и т.д. чашки. Как правило, в первой чашке после культивирования посева появляется рост микробов в виде сплошного налета, в последующих чашках содержание микроорганизмов снижается и образуются изолированные колонии, из которых отсевом можно легко выделить чистую культуру.

Таким образом, в первых секторах получается сплошной рост, а вдоль последующих штрихов вырастут обособленные колонии, представляющие собой потомство одной клетки.

В целях экономии сред и посуды можно пользоваться одной чашкой, разделив ее на сектора, и последовательно засеивать их штрихом (*метод истощающего штриха*). Для этого материал берут петлей и проводят ею ряд параллельных штрихов сначала по поверхности первого сектора, а затем последовательно оставшимися на петле клетками засеивают все другие сектора. При каждом последующем штрихе происходит уменьшение количества засеиваемых клеток.

Метод выделения чистых культур с помощью химических веществ используется при изолировании культур микроорганизмов, устойчивых к определенным химическим веществам. Например, с помощью этого метода можно выделить чистую культуру туберкулезных микобактерий, устойчивых к действию кислот, щелочей и спирта. В этом случае исследуемый материал перед посевом заливают 15 % раствором кислоты или антиформинном и выдерживают в термостате в течение 3...4 часов. После воздействия кислоты или щелочи клетки туберкулезной палочки остаются живыми, а все другие

микроорганизмы, содержащиеся в исследуемом материале, погибают. После нейтрализации кислоты или щелочи обработанный материал высевают на плотную среду и получают изолированные колонии возбудителя туберкулеза.

Биологические методы выделения чистых культур патогенных микроорганизмов основаны на заражении исследуемым материалом лабораторных животных, восприимчивых к данному виду возбудителя. Если патогенный микроорганизм содержится в исследуемом объекте, то лабораторное животное заболевает и погибает. После вскрытия павшего животного из внутренних органов делают посевы на специальные среды, на которых вырастают чистые культуры выделяемых микробов.

5.2 ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1-е занятие

На первом занятии студенты знакомятся с методами выделения чистых и накопительных культур микроорганизмов. Осваивают технику посева исследуемого материала в чашку Петри, в пробирки со скошенным агаром и с жидкой питательной средой.

При выполнении работы необходимо:

1. Для выделения изолированных колоний из бактериальной смеси №1 сделать посев штрихом в чашку Петри с мясопептонным агаром по методу истощающего штриха (см. раздел 5.1.3). Далее чашки помещают в термостат с температурой 37 °С для культивирования в течение 1...2 суток.
2. Для выделения спорообразующих бактерий бактериальную смесь №2 нагреть на водяной бане до 75...85 °С и выдержать в течение 20...30 мин. Далее смесь охладить и сделать посев штрихом бактериологической петлей на поверхность скошенного мясопептонного агара в пробирку. Посев культивируют в течение 1...2 суток при 37 °С.
3. Для выделения подвижных форм бактерий из гниющего мяса по методу Шукевича маленький кусочек мяса стерильной петлей или иглой осторожно (по стенке, где нет питательной среды) вносят в конденсат свежеприготовленного скошенного мясопептонного агара. Пробирки термостатируют при 37 °С в течение 1...2 суток.
4. Для выделения молочнокислых бактерий из сырого молока 0,5 мл молока вносят стерильной пипеткой в пробирку со стерильным обезжиренным молоком с добавлением 5 % этилового спирта. Далее пробирки помещают в термостат с температурой 30 °С и проводят культивирование в течение суток.

Техника посева и пересева микроорганизмов на питательные среды

Посевы и пересевы микроорганизмов на питательные среды проводят около пламени горелки (но не в пламени), по возможности быстро, чтобы не загрязнить культуры посторонними микроорганизмами. Нельзя делать резких движений, ходить, кашлять и т.п. около работающего с чистой культурой, так как движение воздуха увеличивает опасность случайного заражения культуры и среды. Поэтому посевы и пересевы микроорганизмов следует проводить в боксе.

1. Посев на плотные среды в чашки Петри



Посев в чашки Петри производят следующим образом: плотную питательную среду в пробирках или колбах расплавляют на кипящей водяной бане, охлаждают до 48-50 °С и, соблюдая правила асептики, разливают ровным слоем толщиной 3 – 5 мм в стерильные чашки (рис. 7). Посев делают стеклянным шпателем Дригальского (рис. 8) или петлей в виде параллельных или зигзагообразных (метод истощающего посева) штрихов.

2. Посев в жидкую питательную среду

Посев в жидкую среду можно производить бактериологической петлей или пипеткой вблизи пламени горелки. Обе пробирки держат в слегка наклонном положении, чтобы не замочить ватно-марлевые пробки. Петлю с микробным материалом опускают непосредственно в стерильную среду и ополаскивают. При внесении клеток, взятых петлей из плотной среды, материал тщательно растирают по стенке пробирки у верхнего края жидкой среды, все время смывая его средой.

3. Пересев на плотные питательные среды в пробирках

Техника посева по этапам показана на рис. 9.



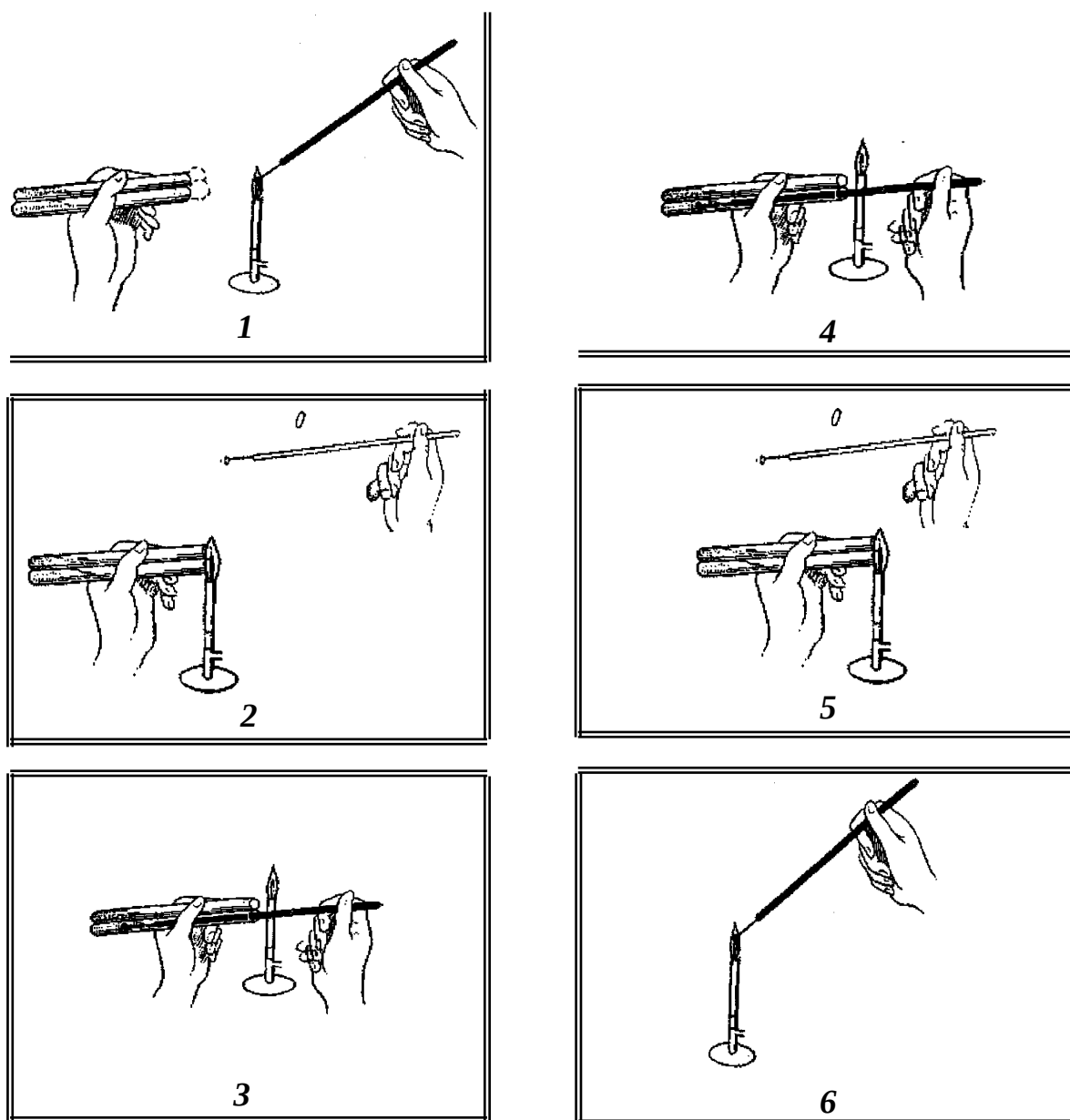


Рис. 9 Пересев культуры микроорганизмов в пробирки

1. Пробирки с культурой и питательной средой помещают на два пальца левой руки в наклонном положении. В правой руке большим и указательным пальцем держат бактериальную петлю и стерилизуют в пламени горелки;
2. Вынимают ватные пробки из обеих пробирок, прижимают их к ладони мизинцем и безымянным пальцами правой руки и обжигают края пробирок. Следят за тем, чтобы пробки не касались посторонних предметов;
3. Петлю вводят в пробирку с пересеваемой микробной культурой. Осторожно, не касаясь стенок, отбирают каплю жидкой культуры. Если производят пересев с косого слоя агара, то для охлаждения петли вначале следует прикоснуться к поверхности агара, где нет культуры, после чего берут небольшое количество микробной массы со скошенной питательной среды;
4. Вводят петлю с материалом в пробирку со стерильной жидкой средой, стараясь не задевать стенок пробирки. При посеве на скошенные

питательные среды петлю с клетками микроорганизмов опускают почти до дна, где скапливается небольшое количество конденсационной воды. Слегка касаясь петлей поверхности плотной среды, но не разрыхляя ее, проводят от дна вверх штрих;

5. Петлю вынимают, обжигают края пробирок и внутренние концы пробок, после чего пробирки закрывают;
6. Петлю вновь прокалывают в пламени горелки.

2-е занятие

На втором занятии студенты исследуют:

- посев бактериальной смеси №1 в чашке Петри

Посевы, сделанные методом истощающего штриха, рассматривают, выделяют изолированные колонии, отличающиеся по внешнему виду, описывают культуральные свойства выделенных чистых культур микроорганизмов, готовят из описанных колоний фиксированные мазки и окрашивают их по методу Грама. Далее зарисовывают микроскопическую картину и делают вывод о качественном составе микрофлоры бактериальной смеси.

- посев штрихом культуры спорообразующих бактерий, полученной методом нагревания их бактериальной смеси №2 исследуют, приготовив фиксированный мазок, окрасив его по методу Грама и проведя микроскопирование для того, чтобы убедиться, что накопительная культура спорообразующих бактерий выделена. Зарисовывают микроскопическую картину.

- посев гниющего мяса в конденсационную воду скошенного мясopентонного агара внимательно рассматривают, бактериальной петлей отбирают с верхней части поверхности скошенного агара мазеобразный налет, готовят фиксированный препарат, окрашивают его по Граму, зарисовывают микроскопическую картину. При обнаружении в мазках грамoтрицательных не образующих спор палочек делают вывод о наличии в исследуемом материале подвижных форм гнилостных бактерий.

- посев сырого молока на накопительную среду в пробирку для выделения молочнокислых бактерий рассматривают и описывают характерные особенности образовавшегося сгустка. Далее готовят фиксированный препарат, окрашивают его краской Муромцева. При микроскопии обращают внимание на внешние признаки выросших на стерильном молоке с 5% спирта молочнокислых бактерий. Зарисовывают микроскопическую картину.

Изучение культуральных свойств выросших в чашках колоний

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

1. Форма колоний

Формы колоний, которые могут вырастать на плотной среде в чашках Петри, изображены на рис. 10.

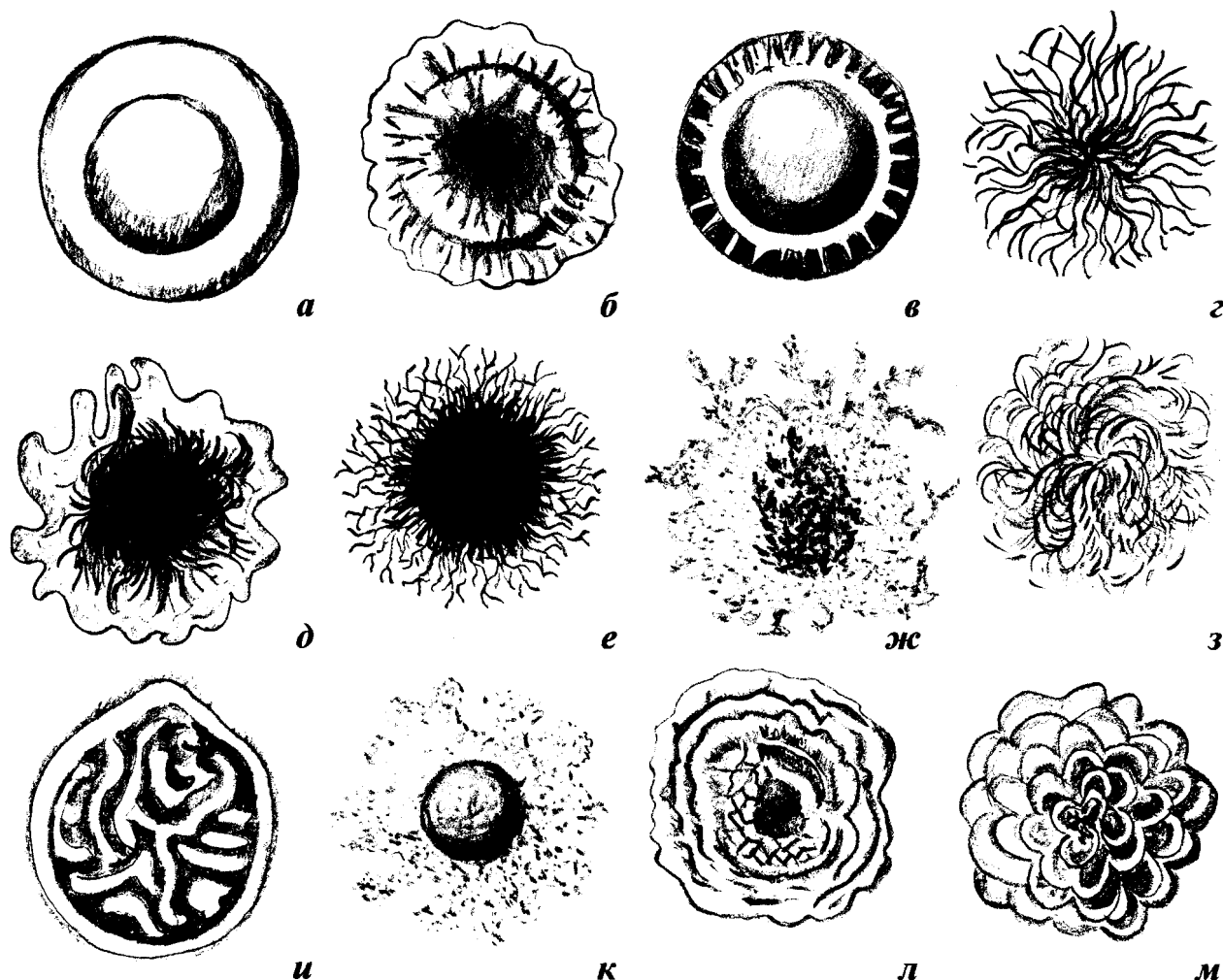


Рис. 10 Форма колоний: а – круглая; б – круглая с фестончатым краем; в – круглая с валиком по краю; г; д – ризоидная; е – с ризоидным краем; ж – амёбовидная; з – нитевидная; и – складчатая; к – неправильная; л – концентрическая; м – сложная

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

2. Размеры колоний

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

3. Цвет колоний

Микроорганизмы, содержащие пигменты могут быть желтого, оранжевого, розового, кремового и др. цветов. Большинство микроорганизмов не содержат пигментов и растут на плотных средах в виде серовато-матовых колоний. Такие колонии называют бесцветными.

4. Рельеф (профиль) колоний

Рельеф или профиль колоний может быть плоским, выпуклым, куполообразным, смешанным - плоским с выпуклым центром, кратерообразным и др. (рис. 10).



Рис. 10 Профиль колоний: *а* – изогнутый; *б* – кратерообразный; *в* – бугристый; *г* – врастающий в агар; *д* – плоский; *е* – выпуклый; *ж* – куполовидный; *з* – конусовидный

5. Поверхность колоний

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

6. Характер края колоний

Разновидности края колоний изображены на рис. 11.

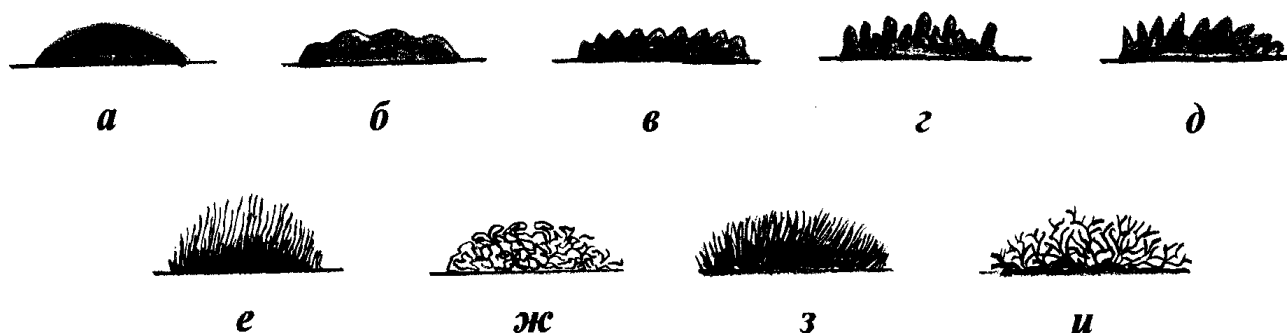


Рис. 11 Края колоний: *а* – гладкий; *б* – волнистый; *в* – зубчатый; *г* – лопастный; *д* – неправильный; *е* – реснитчатый; *ж* – нитчатый; *з* – ворсинчатый; *и* – ветвистый

Край может быть ровным (гладким); волнистым; локонообразным (нитчатым); лопастным; бахромчатым; зазубренным; корневидным (ветвистым) и др.

7. Прозрачность колоний

Колонии бывают прозрачные, полупрозрачные и непрозрачные.

8. Структуру колоний

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

9. Консистенцию колоний

Определяется при приготовлении препаратов для микроскопического анализа.

5.2.3 Изучение морфологических свойств микроорганизмов

Готовят фиксированные препараты бактерий по методике, изложенной в разделе 2.2.2, и окрашивают их по методу Грама (раздел 3.2.1). Рассматривают препараты с объективом х90 при максимальном освещении. При изучении морфологических признаков молочнокислых бактерий фиксированных мазок из кисломолочного сгустка окрашивают краской Муромцева (раздел 2.2.3).

Оформление и анализ результатов исследований

В отчете студенты кратко конспектируют теоретический материал. Описывают культуральные свойства выросших в чашках Петри колоний. Зарисовывают микроскопические картины выделенных из различных объектов чистых и накопительных культур с учетом морфологических особенностей каждого микроорганизма. Под каждым рисунком подписывают увеличение препарата. Делают соответствующие выводы.

Контрольные вопросы

1. Что такое «чистые культуры» микроорганизмов и для чего их выделяют из объектов окружающей среды?
2. Каким образом создаются элективные условия при выделении накопительных культур микроорганизмов?
3. Какие микроорганизмы можно выделить методом нагревания?
4. Как можно выделить накопительные культуры подвижных форм бактерий?
5. Каким образом можно выделить накопительную культуру анаэробных бактерий?
6. Охарактеризуйте методы выделения чистых культур микроорганизмов, основанные на их механическом разделении.
7. Как можно выделить чистую культуру туберкулезной палочки?
8. В чем заключается сущность биологических методов выделения чистых культур патогенных микроорганизмов?
9. По каким признакам описывают культуральные свойства микроорганизмов, выросших на плотных средах в чашках Петри?
10. Перечислите основные этапы посева микроорганизмов из пробирки в пробирку.

СПЕЦИАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6

ПРИНЦИПЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ НА ПРЕДПРИЯТИЯХ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

(выполняется на 2-х занятиях)

Цель работы: Ознакомиться с принципами проведения микробиологического контроля сырья, полуфабрикатов и готовой продукции. Освоить методы определения микроорганизмов в пищевых продуктах в соответствии с требованиями нормативной документации. Изучить качественный состав микрофлоры исследуемого продукта.

Оборудование, материалы: Исследуемые пищевые продукты (крем, маргарин, майонез, питьевое молоко, колбасное изделие, детская молочная смесь, овощные консервы, пиво); пробирки с 9 см³ стерильной воды; стерильные пипетки на 1 см³ и чашки Петри; пробирки со стерильными питательными средами: с МПА или средой для определения КМАФАнМ; со средой Сабуро или сусло-агаром; средой Кесслера с поплавками; с солевым агаром и т.п.; набор красок по Граму; бактериологические петли и препаровальные иглы; фильтровальная бумага; предметные и покровные стекла; микроскоп; спиртовка; лоток с рельсами; промывалка; термостаты.

6.1 КРАТКИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Задача микробиологического контроля - возможно быстрое обнаружение и выявление путей проникновения микроорганизмов-вредителей в производство, очагов и степени размножения их на отдельных стадиях технологического процесса, предотвращение развития посторонней микрофлоры путем использования различных профилактических мероприятий.

Микробиологический контроль проводится заводскими лабораториями систематически. При отсутствии микробиологической лаборатории на предприятии указанный контроль может осуществляться по хоздоговору с органами Госсанэпиднадзора или лабораториями, аккредитованными для проведения микробиологических исследований. Он осуществляется на всех этапах технологического процесса, начиная с сырья и кончая готовым продуктом на основании утвержденных государственных стандартов (ГОСТ), технических условий (ТУ), инструкций, медико-биологических требований и санитарных норм качества продовольственного сырья и пищевых продуктов, а также другой нормативной документации. Для отдельных производств имеются свои схемы микробиологического контроля, в которых определены объекты контроля, точки отбора проб, периодичность контроля, указаны микробиологические показатели, которые необходимо определять, приводятся нормативы по этим микробиологическим показателям.

Многие пищевые продукты являются благоприятной средой для роста и развития посторонних микроорганизмов. Несоблюдение и нарушение технологических режимов переработки сырья, санитарно-гигиенических условий на производстве, нарушение режимов хранения и сроков реализации пищевой продукции может привести к интенсивному накоплению в них микроорганизмов, способных образовывать токсины, что является причиной пищевых отравлений.

Кроме того, при несоблюдении санитарных правил и норм работниками пищевого предприятия в продукты могут попасть патогенные микроорганизмы – возбудители пищевых инфекций. Поэтому важнейшими характеристиками продовольственных товаров являются их *безопасность* и *микробиологическая стойкость*.

Под безопасностью понимают отсутствие вредных примесей химической и биологической природы, в том числе патогенных микроорганизмов и ядовитых продуктов их жизнедеятельности. Понятие «микробиологическая стойкость» подразумевает потенциальные возможности сохранения продукта без порчи.

Микрофлора пищевых продуктов представляет собой сложную динамическую систему, связанную с внешней средой. Это значительно осложняет способы ее исследования и трактовку полученных результатов.

Для оценки качества пищевых продуктов, а также условий их производства и хранения пользуются количественными и качественными показателями. *Количественные показатели* указывают общее число микроорганизмов определенных групп в 1 г (см³) продукта. *Качественные показатели* указывают на отсутствие (присутствие) микробов конкретных видов в определенной массе продукта.

Группы микробиологических критериев безопасности пищевых продуктов

1. Группа показателей санитарного состояния

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

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

Общая бактериальная обсемененность (КМАФАнМ) - количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в 1 г или 1 см³ продукта. В нормативной документации указывают предельное содержание этих микроорганизмов в единицах КОЕ (колониеобразующих единицах).

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

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

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

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

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

- Эти микроорганизмы должны являться представителями нормальной микрофлоры организма, в нем развиваться и размножаться;
- Они должны в больших количествах выделяться из организма;
- В окружающей среде они должны длительное время сохранять свою жизнеспособность, но не размножаться;
- Они не должны изменяться под действием факторов внешней среды, подавляться или стимулироваться другими микроорганизмами;
- Эти микроорганизмы должны равномерно распределяться в исследуемых объектах внешней среды;
- Определение этих микроорганизмов должно осуществляться простыми методами.

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

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

Условно- патогенные микроорганизмы являются микроорганизмами, которые постоянно присутствуют в окружающей среде и в живых макроорганизмах. Благоприятной средой для роста и развития этих микроорганизмов является мясо и мясопродукты, поэтому именно эти продукты чаще всего являются причиной пищевых отравлений. Таким образом, многие из вышеперечисленных микроорганизмов нормируются в колбасных изделиях и других мясных продуктах.

В мясных и многих растительных консервах нормируют содержание сульфитредуцирующих клостридий, которые развиваются в анаэробных условиях.

В молочных продуктах, богатых белком (например, твороге, сыре) нормируется содержание коагулазоположительного золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*) – возбудителя пищевой интоксикации.

При определении условно-патогенных микроорганизмов используют элективные питательные среды. Например, наличие золотистого стафилококка выявляют с помощью молочно-солевого (МСА) или желточно-солевого (ЖСА) агара.

3. Группа патогенных микроорганизмов

Из патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах определяют сальмонеллы. Проводят исследования на наличие сальмонелл органы Санэпиднадзора. Обычно, сальмонеллы не допускаются в 25 г (см³) продукта. В некоторых продуктах детского и диетического питания не допускается наличие сальмонелл в 50 и даже в 100 г (см³).

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

4. Группа показателей микробиологической стабильности продукта. К этой группе относятся микроскопические грибы и дрожжи, которые, как известно, являются возбудителями порчи продукта. Этот показатель нормируется многих продуктах из растительного сырья, а также в продуктах животного происхождения с растительными добавками. Динамику роста грибов и дрожжей обязательно исследуют при установлении сроков годности и режимов хранения новых видов продуктов. Плесени и дрожжи определяют с использованием сусло-агара или среды Сабуро, причем количество колоний грибов и дрожжей, выросших на плотных средах подсчитывают отдельно.

Кроме вышеперечисленных нормируемых микробиологических показателей для прогнозирования качества выпускаемой пищевой продукции целесообразно определять отдельные группы микроорганизмов, которые являются *представителями технически полезной и технически вредной микрофлоры*.

Так, в производстве сыров периодически определяют гнилостные бактерии как основные возбудители порчи сыров, а также следят за развитием полезных микроорганизмов (молочнокислых и пропионовокислых бактерий) в процессе выработки сыров.

6.1.2 Понятие о системе критических контрольных точек (НАССР)

В целях гарантии качества выпускаемой пищевой продукции, ее безопасности за рубежом активно внедряется система критических контрольных точек (НАССР) в качестве основы экспертизы пищевых

продуктов. НАССР расшифровывается как Hazard Analysis Critical Control Point (критические пределы надзора вредных факторов).

Характерной особенностью данной системы является планомерный надзор и контроль пищевых продуктов при предварительном определении всех возможных факторов, связанных с полным циклом обращения с пищевыми продуктами. Этот надзор начинается с контроля условий выращивания животных и контроля условий произрастания растений; с контроля среды обитания промысловых животных и гидробионтов. Далее проводят контроль условий получения сырья, и контроль производства определенного продукта из этого сырья. Заканчивается надзор исследованием готового продукта после его приготовления, хранения, транспортировки и реализации.

Эта система существенно отличается от ранее применявшегося метода санитарно-гигиенического контроля и надзора, в котором основное внимание было уделено надзору лишь конечных продуктов.

Хотя система критических контрольных точек была разработана для микробиологического контроля пищевых продуктов, в последнее время она успешно применяется и для контроля и предотвращения остаточных химических веществ, в том числе и химикатов сельскохозяйственного назначения (удобрений, гербицидов, пестицидов и др.), антибактериальных веществ, гормонов, а также включений инородных веществ в пищевые продукты.

Международным комитетом по стандартизации микроорганизмов пищевых продуктов (ICMSF) рекомендовано Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) внедрить НАССР в международный стандарт. В настоящее время в странах ЕС считается обязательным обработка и производство импортированных мяса и морепродуктов с применением системы НАССР.

Микробиологический контроль качества некоторых пищевых продуктов

При проведении микробиологического исследования пищевых продуктов в можно руководствоваться медико-биологическими требованиями и санитарными нормами качества продовольственного сырья и пищевых продуктов (СанПиН 2.3.2.560-96). Микробиологические нормативы для продуктов детского питания представлены в методических указаниях (МУК 4.2.577-96) «Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов». Выписка из этих документов по отдельным группам пищевых продуктов представлена в приложении данного лабораторного практикума.

Кремовые кондитерские изделия

Кремы, используемые для изготовления тортов и пирожных, является скоропортящейся продукцией, которая может послужить причиной пищевых отравлений. Помимо различных споровых и неспоровых бактерий, дрожжей, спор плесеней, в кремах могут присутствовать патогенные микроорганизмы.

Особенно опасен заварной крем, который отличается от других кремов низкой концентрацией сахара, повышенной влажностью и содержанием муки. Помимо того, что заварной крем быстро закисает в результате развития кислотообразующих бактерий, в нем могут развиваться токсигенный золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) и некоторые условно-патогенные микроорганизмы (например, энтеропатогенные кишечные палочки). Следует помнить, что накопление токсинов в кремовых изделиях происходит при температуре от 15 до 22 °С.

Причинами инфицирования крема может быть сырье (молоко, сливки, сахар, масло, яйца). Нарушение технологического режима и санитарных правил при изготовлении и хранении крема и кремовых изделий приводит к интенсивному развитию микроорганизмов, внесенных с сырьем и микроорганизмов, попадающих в крем в процессе его производства и хранения. Поэтому, в соответствии с требованиями по хранению и реализации скоропортящихся продуктов торты и пирожные с различными кремами разрешается хранить при температуре не выше 6 °С в течение ограниченного времени (например, с белково-сбивным кремом не более 72 часов).

Готовые кремовые изделия подвергают микробиологическому контролю. КМАФАнМ в зависимости от вида крема должно быть не выше значения $1 \cdot 10^4$ - $1 \cdot 10^5$ КОЕ/г; БГКП не допускаются в 0,01 г; золотистый стафилококк – в 1 г заварного и в 0,01 г сливочного крема. Патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы должны отсутствовать в 25 г крема (приложение).

Маргарин и майонез

Маргарин. Микроорганизмы в производстве маргарина играют двоякую роль. Молочнокислые бактерии, которые входят в состав водно-молочной фазы являются полезной микрофлорой маргарина, так как придают ему специфический вкус и аромат. Все остальные микроорганизмы, которые попадают с сырьем, из внешней среды являются вредителями производства, снижающими качество маргарина и его стойкость при хранении. Основными источниками посторонней микрофлоры маргарина являются компоненты водно-молочной фазы, так как жиры и растительные масла являются неблагоприятной средой для развития микроорганизмов. Микробную порчу маргарина вызывают гнилостные бактерии, которые попадают в маргарин с молоком (вызывают порок горького вкуса), грибы, дрожжи, флуоресцирующие бактерии (вызывают прогорклый вкус и неприятный запах, грибы также являются причиной образования пигментных пятен на маргарине), термоустойчивые молочнокислые бактерии (вызывают излишне кислый вкус). Качество маргарина оценивается по наличию БГКП – не допускаются в 0,01 г, по содержанию в маргарине дрожжей (не более 5×10^3 КОЕ/г) и плесеней (не более 20 КОЕ/г). Сальмонеллы не допускаются в 25 г маргарина.

Майонез. В производстве майонеза не используются промышленно полезные микроорганизмы. В этом продукте может находиться только технически вредная микрофлора, попадающая в майонез с поверхности оборудования, и остаточная микрофлора компонентов майонеза. Представители технически вредной микрофлоры майонеза вызывают его газообразование

(возбудители порчи - гетероферментативные молочнокислые бактерии и дрожжи), бомбаж банок (возбудитель – маслянокислые бактерии рода *Clostridium*), горький вкус (возбудители порчи гнилостные бактерии). В маргарине нормируется наличие БГКП (не допускаются в $0,1 \text{ см}^3$), содержание дрожжей (не более $5 \times 10^2 \text{ КОЕ/см}^3$), количество плесеней (не более 10 КОЕ/см^3), наличие сальмонелл (не допускаются в 25 см^3).

Питьевое молоко

Микрофлора питьевого молока состоит из остаточной микрофлоры пастеризованного молока (представлена спорами бацилл и клостридий, а также термостойкими молочнокислыми палочками) и микрофлоры вторичного обсеменения (бактериями группы кишечной палочки, психрофильными гнилостными бактериями, мезофильными молочнокислыми стрептококками и палочками, дрожжами и др.). Микроорганизмы, попадающие в питьевое молоко, могут вызвать пороки консистенции, вкуса и цвета молока. Нормируемые показатели качества питьевого молока представлены в приложении данного лабораторного практикума. Так, для пастеризованного молока в бутылках и пакетах группы А, общая бактериальная обсемененность (КМАФАнМ) не должна превышать значения $5 \times 10^4 \text{ КОЕ/см}^3$, БГКП и золотистый стафилококк не допускаются в 1 см^3 молока, а патогенные микроорганизмы, в т.ч. сальмонеллы – в 25 см^3 .

Колбасные изделия

Колбасы относятся к продуктам, употребляемым в пищу без предварительной термической обработки. В связи с этим колбасы должны отвечать высоким санитарным требованиям. Источниками микрофлоры колбасных изделий являются сырье и микрофлора вторичного обсеменения, попадающая в колбасные изделия в процессе переработки сырья. Поэтому технологические процессы выработки колбасных изделий направлены на придание им соответствующих свойств и на уничтожение микроорганизмов.

Количественный и качественный состав микрофлоры колбас зависит от вида и сорта колбасы. В вареных колбасах, подвергнутых действию высоких температур ($68...70^\circ\text{C}$ внутри батона), погибают бесспорные бактерии, но остаются невредимыми споры и частично кокковые формы и единичные палочки, т.к. они бывают защищены слоем жира. Стойкость колбасных изделий при хранении зависит от содержания в них влаги, поваренной соли, степени пропитки антисептическими веществами дыма, а главное – от микробного загрязнения колбас. При соблюдении в колбасном производстве санитарно-гигиенических требований и использовании доброкачественного сырья бактериальная обсемененность свежесделанных готовых изделий составляет: вареных колбас – 10^3 в 1 г , полукопченых – 10^2 , ливерных – 10^4 - 10^5 . Порчу колбас вызывают молочнокислые бактерии (прокисание колбас), гнилостные не спорообразующие палочковидные бактерии и микрококки (ослизнение оболочек), плесени (плесневение колбас) и другие микроорганизмы.

Нормируемыми микробиологическими показателями колбасных изделий являются КМАФАнМ, наличие БГКП, золотистого стафилококка,

сульфитредуцирующих клостридий и патогенных микроорганизмов, в т.ч. сальмонелл (см приложение).

Сусло и пиво

Производство пива ведется в не стерильных условиях. Поэтому не исключено попадание в сусло, молодое и готовое пиво разнообразных микроорганизмов.

Микроорганизмы, развивающиеся в сусле и пиве, принадлежат к различным группам – к бактериям, микроскопическим грибам и дрожжам. По количеству представителей и по причиняемому ущербу первое место принадлежит бактериям. Это сусловые бактерии (родов *Flavobacterium*, *Zytophas* и др.), бактерии, которые могут развиваться в сусле и пиве (молочнокислые, уксуснокислые бактерии, пивные сарцины и др.). Попадая в производство, они постепенно адаптируются к условиям технологического процесса, видоизменяются и так приспосабливаются, что борьба с этими микроорганизмами затруднительна, а наносимый вред может выражаться не только в ухудшении стойкости пива, но и в порче его вкуса вплоть до полной непригодности. Широкое распространение в отечественном пивоварении как вредители получили и дрожжи. Эти микроорганизмы также как и бактерии снижают биологическую стойкость пива и ухудшают его вкус и аромат. Микроскопические грибы, в отличие от бактерий и дрожжей, хотя и часто встречаются в пивоваренном производстве, однако редко вызывают его порчу. Это связано с тем, что грибы относятся к аэробным микроорганизмам, а в процессе сбраживания сусла создаются анаэробные условия.

При оценке качества пива принято проводить микробиологический контроль пива на общую бактериальную обсемененность (КМАФАнМ) и наличие БГКП (см приложение 2).

Овощные консервы

В зависимости от pH и химического состава овощные консервы можно отнести к четырем группам:

1. *К группе А* относятся консервы этой группы подвергаются стерилизации. К этой группе относятся низкокислотные натуральные овощные консервы с pH 4,2...5,2 (зеленый горошек, стручковая фасоль, кукуруза, цветная капуста и др.). В консервируемых продуктах группы А допускается присутствие небольшого количества спор непатогенных микроорганизмов при условии, что эти споры не разовьются в консервах во время хранения.
2. *К группе Б* относятся стерилизуемые неконцентрированные томатопродукты и пастеризуемые концентрированные томатопродукты с нерегулируемой кислотностью. Технологический процесс термической обработки томатопродуктов должен быть отрегулирован таким образом, чтобы число спор мезофильных клостридий не превышало в них 1 споры в 2 см³, а термофильных анаэробов было не более чем одна спора в 1 см³.
3. *К группе В* относятся кислотные консервы с pH от 3,7 до 4,2. Такие консервы подвергают термической обработке при 100...110 °С. Термическая обработка должна обеспечить гибель газообразующих мезофильных бацилл - возбудителей порчи.

4. *К группе Г* относятся высококислотные овощные консервы. Такие консервы подвергают пастеризации при 75...100 °С, поэтому в остаточной микрофлоре этих консервов могут присутствовать микроскопические грибы, молочнокислые бактерии, дрожжи и др. микроорганизмы. Пастеризация этих продуктов должна гарантировать гибель БГКП и сальмонелл.

Таким образом, перед тем как проводить микробиологическое исследование овощных консервов нужно определить к какой их вышеперечисленных групп они относятся. Особо тщательно проверяют консервы с рН более 4,2-4,4 в которых возможно развитие возбудителей пищевых отравлений.

Допустимая общая бактериальная обсемененность (КМАФАнМ) консервов перед их стерилизацией нормируется. Общее число бактерий в 1 г (1 см³) продукта не должно превышать 10 000 – 50 000 (в зависимости от вида продукта), а в консервах для детского питания – 200. Клостридии должны отсутствовать в 0,5 см³ содержимого банки. Мезофильных бацилл допускается не более 100-300/г.

При исследовании готовых консервов проверяют банки на герметичность, термостатируют банки при 37 °С в течение 5 суток, далее отбирают пробы из банок и проводят микробиологическое исследование. Сохранение нормального внешнего вида тары после термостатирования является одним из показателей микробиологической стабильности консервов. Содержимое дефектных банок с признаками микробной порчи (содержание таких банок допускается не более 0,2 %) анализируют для установления природы дефекта.

Сухие детские смеси

Как видно из табл. приложения, к продуктам детского и лечебного питания предъявляются более жесткие требования, чем к продуктам массового потребления. Соответственно, к промышленному сырью и компонентам, используемым для изготовления продуктов детского питания, также предъявляются повышенные микробиологические требования.

Так, в сухих молочных продуктах, предназначенных детей грудного возраста, нормируются КМАФАнМ (от 2×10^3 до $2,5 \times 10^4$ КОЕ/г), количество плесеней (от 5×10 до 1×10^2 КОЕ/г), содержание дрожжей (от 10 до 5×10 КОЕ/г), количество спор *Bacillus cereus* (не более 1×10^2 - 2×10^2 КОЕ/г), не допускается наличие БГКП в 1г, *E. coli* – в 10 г, золотистый стафилококк – в 1...10 г, патогенные микроорганизмы, в т.ч. сальмонеллы – в 50...100 г.

6.2 ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1-е занятие

На первом занятии студенты знакомятся с принципами микробиологического контроля на предприятиях пищевой промышленности; группами микробиологических критериев безопасности пищевых продуктов и системой НАССР; с микрофлорой, особенностями проведения и схемой микробиологического исследования определенного пищевого продукта. Далее

они готовят разведения анализируемого продукта и проводят посев этих разведений на плотные и жидкие питательные среды для определения нормируемых микробиологических показателей и определения содержания микроорганизмов, которые в данном продукте не нормируются, но имеют значение при прогнозировании качества исследуемого продукта.

6.2.1 Схема разведения пищевого продукта и проведения микробиологического исследования

Для приготовления разведений продукта используют пробирки с 9 см^3 стерильной воды. Иногда для приготовления разведений используются стерильные растворы разбавленного фосфатного буфера, изотонического раствора хлорида натрия, пептонной воды или лимоннокислого натрия. В первую пробирку стерильной пипеткой вносят 1 см^3 продукта. Новой стерильной пипеткой тщательно перемешивают содержимое пробирки (разведение 1:10). Затем этой же пипеткой из пробирки с разведением 1:10 отбирают 1 см^3 жидкости и переносят во вторую пробирку с водой (разведение 1:100). Количество разведений рассчитывают таким образом, чтобы в чашках Петри выросло от 30 до 300 колоний.

Так, при исследовании пастеризованного молока рекомендуется готовить I, II и III разведение продукта, так как нормируемое значение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в питьевом молоке не более 50...200 тыс. КОЕ/ см^3 (см. приложение 3).

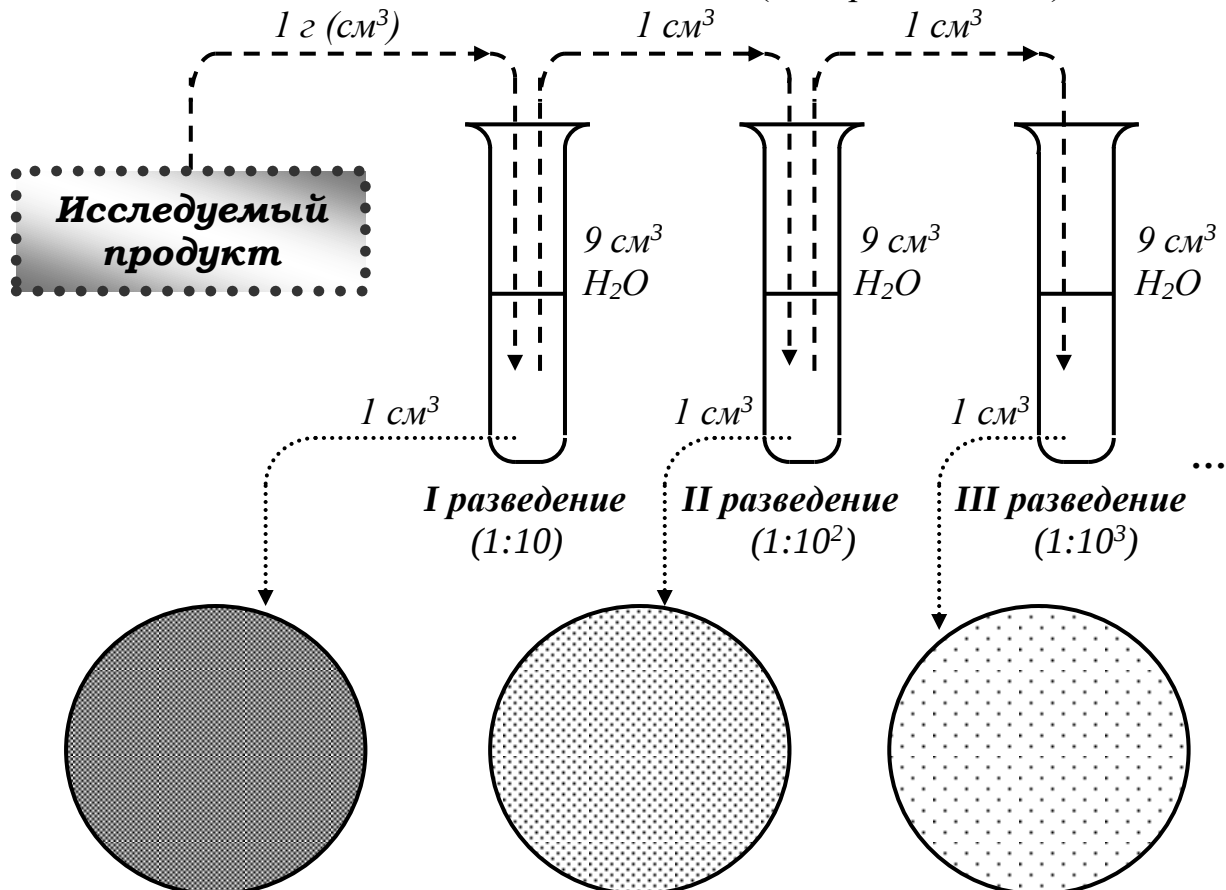


Рис. 12 Схема приготовления разведений продукта

и высева его в чашки Петри

Рекомендации при приготовлении I разведения (1:10):

- *из кондитерских изделий с кремом, из маргарина*
1 г крема или маргарина взвешивают с соблюдением правил асептики и вносят в пробирку с 9 см³ воды. Затем пробирку помещают в водяную баню с температурой 50...55 °С. Выдерживают пробирку на водяной бане до полного расплавления крема. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и для последующих разведений отбирают 1 см³ жидкости, находящейся под слоем масла;
- *из продуктов, имеющих плотную и неоднородную консистенцию (например, из колбасных изделий, овощных консервов)*
1 г средней пробы исследуемого продукта взвешивают с соблюдением правил асептики, помещают в стерильную ступку. В ступку также вносят 9 см³ стерильной воды, и материал растирают с песком в течение 10...15 мин вблизи пламени горелки до получения однородной массы. Далее дают взвесям осесть и отбирают 1 см³ надосадочной жидкости для приготовления разведения 1:100.

6.2.2 Чашечные методы количественного учета микроорганизмов

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

Учет результатов при использовании чашечных методов

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

Если инкубированные чашки с первым разведением (1:10) не содержат колоний, то результат выражают так: меньше 1х10 КОЕ/см³ (КОЕ – колониобразующие единицы);

Если в чашках Петри с I разведением (1:10) содержится меньше, чем 15 колоний, то результат выражается так: количество микроорганизмов менее Мх10 КОЕ/г, где М – число выросших колоний;

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

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

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

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

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

6.2.2.1 Определение мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ)

Перед посевом чашки маркируют.

По 1 см^3 разведений продукта вносят в чашки Петри. Пипетку с посевным материалом держат под углом 45°C , касаясь концом пипетки дна чашки. Затем в каждую чашку наливают по $12\text{--}15 \text{ см}^3$ мясопептонного агара или среды для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, расплавленной и охлажденной до 45°C . Сразу после заливки агара содержимое тщательно перемешивают путем легкого вращательного покачивания для равномерного распределения посевного материала. Если ожидают ползучий рост микроорганизмов посевы после застывания агара заливают вторым слоем питательной среды или $3\text{--}5 \text{ см}^3$ водного раствора агара. После застывания среды чашки Петри переворачивают крышками вниз и помещают в термостат при $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 72 часа (допускается предварительный учет через 48 часов с последующим окончательным учетом через 24 часа).

6.2.2.2 Определение количества грибов и дрожжей

Ведут так же, как и определение КМАФАнМ, только в качестве питательной среды используют сусло-агар или среду Сабуро. Инкубацию посевов ведут при температуре 24°C в течение 5 суток с предварительным учетом через 3 суток.

6.2.2.3 Определение протеолитических (гнилостных) бактерий

Соответствующее разведение продукта засевают на молочный агар инкубацию посевов проводят при 30°C в течение 72 часов. Протеолитические бактерии на молочном агаре при своем росте образуют зоны просветления агара (зоны протеолиза). Пептонизирующие бактерии образуют узкие зоны пептонизации.

6.2.2.4 Определение коагулазоположительных стафилококков

Ведут так же, как и определение КМАФАнМ. В качестве питательной среды используют молочно-солевой или желточно-солевой агар. Культивирование проводят при 37°C в течение $24\text{--}48$ часов. При росте на желточно-солевом агаре вокруг колоний образуются перламутровые зоны помутнения агара, а на молочно-солевом агаре – небольшие зоны пептонизации.³

6.2.2.5 Определение аэробных спорообразующих бактерий рода *Bacillus*

Исследуемый материал или разведение продукта перед посевом пастеризуют при 75...85 °С в течение 20 мин. Далее ведут определение так же, как и при определении КМАФАнМ. После пастеризации вегетативные клетки погибают, а споры после посева на МПА и культивирования при 37 °С прорастают и в течение 24...48 час образуют колонии.

6.2.3 Методы, основанные на накоплении микроорганизмов с последующей их идентификацией

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

К таким методам относятся определение наличия БГКП, сальмонелл.

6.2.3.1 Определение бактерий группы кишечной палочки

Для посева используют то количество продукта, в котором предусматривается отсутствие БГКП (1 см³ молока или 1 см³ первого разведения молока). Посев проводят в пробирки со средой Кесслера с поплавками. Посевы помещают в термостат с температурой 37°С на 24 часа.

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

При положительной бродильной пробе для окончательного заключения о наличии в продуктах БГКП из подозрительных пробирок производят посев на чашки со средой Эндо или Левина. Посев производят петлей из каждой пробирки так, чтобы получить рост изолированных колоний. Чашки помещают в термостат.

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

6.2.3.2 Определение сальмонелл

Асептически взвешенные навески сухих компонентов или стерильно отмеренные объемы жидких компонентов (обычно 25 г или 25 см³) засевают в колбы с магниевой средой или средой Мюллера (накопительные среды для сальмонелл), соблюдая соотношение продукта и среды не менее 1 : 9.

Для жидких продуктов допускается использование среды с двойной концентрацией ингредиентов при соотношении продукта и среды 1 : 1.

Колбы с посевами помещают в термостат с температурой 37 °С на 18...24 часа.

После инкубации в термостате производят высев из колб с накопительными средами на поверхность дифференциально-диагностических сред (среду Плоскирева или висмут-сульфитный агар). Для получения отдельных колоний петлей берут минимальное количество посевного материала и производят посев штрихом. Чашки с посевами помещают в термостат с температурой 37 °С. Проверку посевов осуществляют дважды: через 24 и 48 ч после инкубации в термостате.

Учет результатов. На среде Плоскирева колонии сальмонелл бесцветные, прозрачные, плоские, на висмут-сульфитном агаре – черные, с характерным металлическим блеском, зеленоватые с черным ободком, при этом наблюдается прокрашивание в черный цвет участка среды под колонией.

При отсутствии типичных колоний сальмонелл на каждой из сред конечный результат анализа записывают как «отрицательный», т.е. в исследуемой массе продукта сальмонеллы отсутствуют.

При наличии на любой из питательных сред на чашках Петри типичных или подозрительных колоний на сальмонеллы, производят их дальнейшее изучение по биохимическим и другим признакам.

6.2.4 Другие методы определения качественных микробиологических показателей

6.2.4.1 Определение анаэробных сульфитредуцирующих клостридий

В пробирки, содержащие 9 см³ расплавленной и охлажденной до 45 °С плотной среды Вильсона-Блера вносят, соблюдая правила асептики, 1 см³ соответствующих разведений исследуемого продукта. Тщательно перемешивают содержимое пробирки, помещают в термостат и культивируют при 37°С в течение 24 часов. За положительный титр принимают то максимальное разведение продукта, в посеве которого произошло почернение среды.

6.2.4.2 Определение бактерий рода *Proteus*

Ведут методом Шукевича. Для определения 0,5 см³ анализируемой взвеси (разведения) вносят в конденсационную воду свежескошенного агара, не касаясь поверхности среды.

Вертикально поставленные пробирки термостатируют при 37 °С в течение 24 часов. На скошенном агаре палочка протей прорастает в виде голубоватого вуалеобразного налета. При микроскопии препарата обнаруживаются грамотрицательные неспорообразующие палочки.

2-е занятие

На втором занятии студенты исследуют посевы разведений продукта, подсчитывают количество выросших колоний в чашках Петри на мясопептонном агаре или среде для определения мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, среде Сабуро и т.д. Учет результатов при использовании чашечных методов ведут согласно п. 2.2.2. Изучают посевы продукта или его разведений в пробирках со средой Кесслера и поплавками. Если в пробирках со средой Кесслера газообразования в поплавках не наблюдается, то делают заключение об отсутствии БГКП во взятом на анализ объеме продукта. Полученные данные сравнивают с нормируемым значением, пользуясь приложением 3. Затем изучают качественный состав микрофлоры исследуемого продукта.

6.2.5 Изучение культуральных свойств выросших в чашках колоний

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

Рассматривая выросшие колонии в проходящем свете невооруженным глазом (макроскопически) и с помощью лупы описывают культуральные свойства по методике, описанной в разделе 5.2.2.

6.2.6 Изучение морфологических свойств микроорганизмов

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

Фиксированные мазки окрашивают по Граму (см разд. 3.2.1) и микроскопируют с использованием иммерсионного объектива (на х90). При микроскопировании препаратов обращают внимание на форму клеток; их взаимное расположение; наличие спор; отношение к окраске по Граму. Эти признаки позволяют отнести микроорганизмы к определенной группе.

Исследование препаратов микроскопических грибов ведут по методике, описанной в разделе 4.2.1.

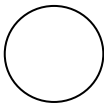
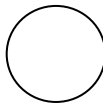
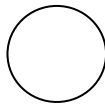
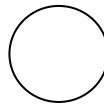
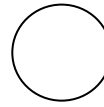
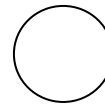
Оформление и анализ результатов исследований

В отчете студенты кратко конспектируют теоретический материал. Результаты определения микробиологических показателей записывают, сравнивают с нормируемыми значениями (см. приложение 2). По результатам исследований студенты делают вывод о качестве исследованного продукта.

При изучении качественного состава микрофлоры продукта результаты исследований вносят в таблицу:

Таблица 1. Культуральные и морфологические признаки выросших в чашках колоний

Культуральные свойства	Питательные среды					
	МПА		Среда Сабуро		...	
	1	2...	1	2...	1	2...
1. Форма колоний						
.						
.						
9. Консистенция						

Микроскопическая картина						
--------------------------	---	---	---	--	---	---

После заполнения таблицы делается вывод о качественном составе микрофлоры исследованного продукта.

Контрольные вопросы

1. *Какая главная задача микробиологического контроля сырья, полуфабрикатов и готовой продукции на предприятиях пищевой промышленности?*
2. *Кем и на основании каких документов проводится микробиологическое исследование пищевых продуктов?*
3. *Дать определение понятиям «безопасность» и «микробиологическая стойкость» пищевых продуктов.*
4. *Перечислить группы микробиологических критериев безопасности пищевых продуктов.*
5. *Какие микробиологические показатели относятся к группе показателей санитарного состояния пищевых продуктов?*
6. *Что такое общая бактериальная обсемененность (КМАФАнМ)? С какой целью определяется этот показатель?*
7. *В каких продуктах КМАФАнМ не определяется?*
8. *С какой целью в пищевых продуктах определяют БГКП?*
9. *Какие требования предъявляются к санитарно-показательным микроорганизмам?*
10. *С какой целью и в каких продуктах определяются условно-патогенные микроорганизмы?*
11. *Зачем в пищевых продуктах определяют содержание грибов и дрожжей? Во всех ли пищевых продуктах эти показатели нормируются?*
12. *Какие патогенные микроорганизмы нормируются в пищевых продуктах?*
13. *Дать понятие о системе критических контрольных точек (НАССР), используемой за рубежом.*
14. *Какие микробиологические показатели нормируются в определенных пищевых продуктах (в кремовых изделиях, в колбасных изделиях, в питьевом молоке, в маргарине и т.д.)?*
15. *Как готовятся разведения пищевых продуктов?*
16. *В чем сущность чашечных методов определения микроорганизмов в пищевых продуктах?*
17. *Какие микробиологические показатели определяются чашечными методами?*
18. *В чем сущность методов, основанных на накоплении микроорганизмов с последующей идентификацией? Какие микробиологические показатели определяются этими методами?*

19. *Какими методами определяются КМАФАнМ, наличие БГКП, титр анаэробных сульфитредуцирующих клостридий?*
20. *Как описываются культуральные свойства выросших в чашках колоний микроорганизмов?*
21. *Каким образом проводят определение коагулазоположительных стафилококков?*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №7

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАКВАСОК И КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Цель занятия: Ознакомиться с полезной микрофлорой заквасок и классификацией кисломолочных продуктов в зависимости от состава микрофлоры заквасок.

Ознакомиться с микробиологическими методами контроля качества заквасок и кисломолочных продуктов.

Освоить метод микроскопического исследования заквасок и кисломолочных продуктов на наличие посторонней микрофлоры.

Оборудование и материалы: Микроскоп; спиртовка; предметные стекла; бактериологические петли; иммерсионное масло; краска Муромцева; фильтровальная бумага; лоток с рельсами; промывалка.

Кисломолочные продукты (кефир, сметана, творог, ряженка, йогурт, кисломолочный бифидопродукт, кисломолочный продукт с ацидофильной палочкой); жидкие закваски на стерильном молоке;

КРАТКИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Закваски – чистые культуры или смесь чистых культур молочнокислых бактерий, вносимые в молоко с целью получения высококачественных кисломолочных продуктов. Закваски используются также в производстве маргарина.

На заводах и в лабораториях по производству бактериальных препаратов выпускают жидкие и сухие бактериальные концентраты, а также маточные закваски в виде сухих и жидких заквасок. Эти бактериальные препараты высылают на предприятия, где путем последовательного их пересева в возрастающие объемы молока, получают лабораторные закваски (при культивировании микрофлоры бактериальных препаратов на стерильном молоке) и, далее, производственные закваски (путем пересева лабораторной

закваски на стерильное или пастеризованное молоко). Производственные закваски используют в производстве кисломолочных продуктов.

Производственные закваски на предприятии получают в отделениях чистых культур или в специальном боксе при микробиологической лаборатории предприятия. В этих помещениях необходимо поддерживать асептические условия. Не допускается одновременно проводить посевы по контролю готовой продукции, контролю условий производства и готовить закваски. Нельзя применять закваски и бактериальные концентраты с истекшим сроком хранения. Флаконы с заквасками вскрывают непосредственно перед употреблением и используют все содержимое флакона сразу.

7.1.1 Морфологические свойства некоторых бактерий, входящих в состав микрофлоры заквасок

Молочнокислые стрептококки

Представляют собой шаровидные или овальные клетки размером до 1-2 мкм в диаметре, располагающиеся короткими цепочками или попарно. Молочнокислые стрептококки неподвижны, спор и капсул не образуют, по Граму окрашиваются положительно. Клетки ароматобразующих стрептококков (*Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus acetoinicus*) мельче, чем клетки молочного и сливочного стрептококков (*Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*), а клетки термофильного стрептококка (*Streptococcus thermophilus*) самые крупные.

К гомоферментативным относятся молочный и сливочный стрептококки, а к гетероферментативным – ароматические стрептококки.

Промежуточное положение между гомоферментативными и гетероферментативными молочнокислыми стрептококками занимает термофильный стрептококк, поэтому его иногда называют среднететерогенным видом.

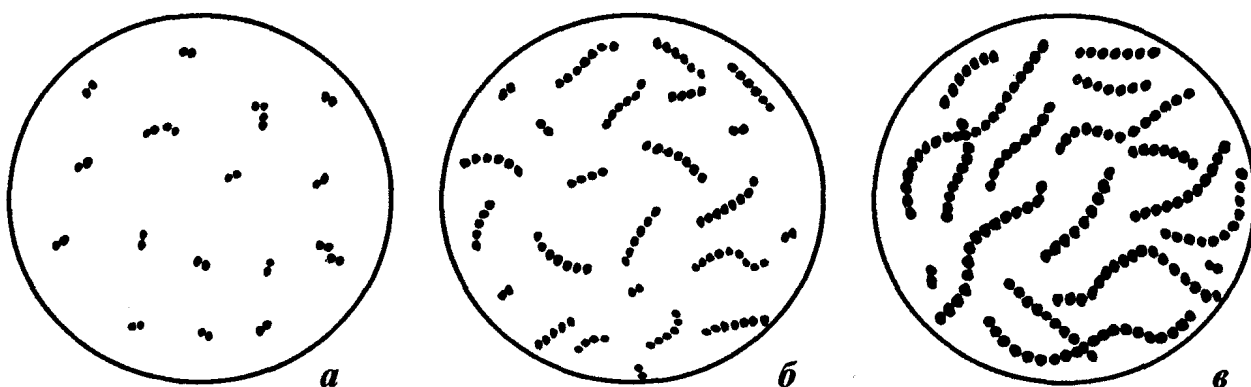


Рис. 13 Молочнокислые стрептококки:
а – молочный стрептококк; б – сливочный стрептококк; в – термофильный стрептококк

Молочнокислые палочки

Лактобактерии представляют собой палочки, одиночные, соединенные попарно и цепочками размером $(4...10 \times 0,5...0,6)$ мкм. Они неподвижны, спор и капсул не образуют, по Граму красятся положительно.

Молочнокислые палочки относятся к роду *Lactobacillus*, включающему три подрода: термобактерии, стрептобактерии и бета-бактерии. Термо- и стрептобактерии являются гомоферментативными, а бета-бактерии - гетероферментативными молочнокислыми палочками. К термобактериям относятся 8 видов палочек, наиболее известными из которых являются *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*. Подрод стрептобактерий включает 7 видов, среди которых в молочной промышленности используются *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*. В подрод бета-бактерий входят 11 видов палочек, наиболее изученными из которых являются *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*.

Клетки стрептобактерий мельче, чем клетки термобактерий, и часто располагаются в виде цепочек. Бета-бактерии имеют наиболее мелкие и тонкие клетки.

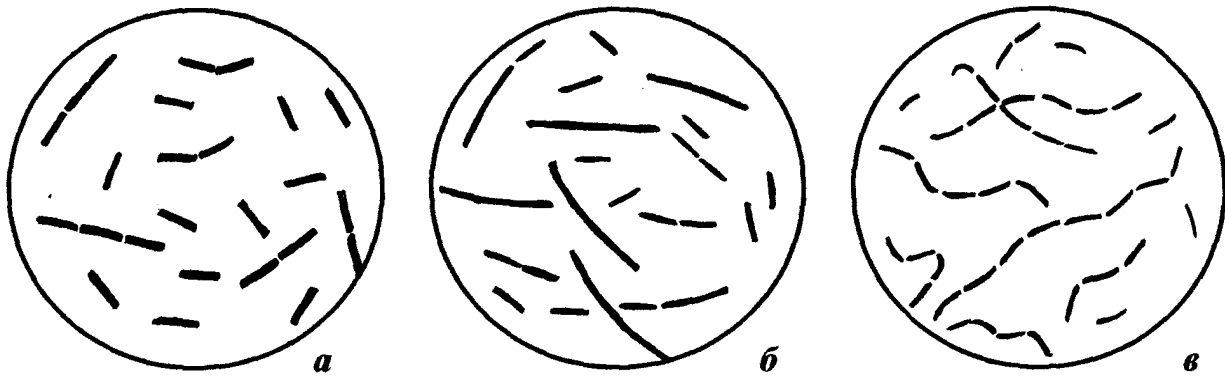


Рис. 14 Молочнокислые палочки:

а – болгарская палочка; б – ацидофильная палочка; в – сырная палочка

7.1.2 Характеристика микрофлоры некоторых кисломолочных продуктов

Кефир готовится с использованием естественной симбиотической закваски – *кефирного грибка*. Кефирные грибки – прочное симбиотическое образование. Они имеют всегда определенную структуру и передают свои свойства и структуру последующим поколениям. Они имеют неправильную форму, сильноскладчатую или бугристую поверхность, консистенция их упругая, мягко-хрящеватая, размеры от 1-2 мм до 3-6 см и более. В состав кефирного грибка входят ряд молочнокислых бактерий: мезофильные молочнокислые стрептококки видов *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*; ароматобразующие бактерии видов *Streptococcus diacetylactis*, *Leuconostoc dextranicum*; молочнокислые палочки рода *Lactobacillus*; уксуснокислые бактерии; дрожжи. При микроскопировании срезов кефирного грибка обнаруживаются тесные переплетения палочковидных нитей, которые образуют строуму грибка, удерживающую остальные микроорганизмы.

Процесс сквашивания и созревания кефира ведут при температуре 20-22°C в течение 10-12 часов.

Творог, сметана. При приготовлении этих продуктов процесс сквашивания молока проводят при температуре 30°C в течение 6-8 часов. В состав микрофлоры этих продуктов входят гомоферментативные стрептококки: *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*; гетероферментативные ароматобразующие стрептококки: *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus acetoinicus* и ароматобразующие лейконостоки вида *Leuconostoc dextranicum*. Гомоферментативные молочнокислые стрептококки и гетероферментативный ароматический стрептококк *Streptococcus diacetylactis* входят также в состав микрофлоры закваски для маргарина.

Сметану Любительскую, молочно-белковую пасту «Здоровье», творог, вырабатываемый ускоренным методом, а также напитки пониженной жирности с плодово-ягодными наполнителями готовят с использованием мезофильных и термофильных стрептококков. Мезофильные стрептококки осуществляют активное течение молочнокислого процесса и участвуют в обеспечении влагоудерживающей способности сгустка. Основной функцией термофильных стрептококков является обеспечение необходимой вязкости сгустка, способности его к удерживанию сыворотки и восстановление структуры после перемешивания. Сквашивание молока в этом случае ведут при температурах 35-38°C в течение 6-7 часов.

Йогурт, простоквашу Южную, ряженку и варенец готовят с использованием термофильных молочнокислых бактерий. Процесс сквашивания ведут при температуре 40-45°C в течение 3-5 часов. В состав микрофлоры йогурта и простокваши Южная входят термофильный стрептококк (*Streptococcus thermophilus*) и болгарская палочка (*Lactobacillus bulgaricus*) в соотношении 4:1...5:1. Применяют также симбиотическую закваску этих микроорганизмов. В производстве ряженки и варенца используют закваску термофильного молочнокислого стрептококка в количестве 3-5%. Иногда добавляют болгарскую палочку.

Продукты лечебно-профилактического назначения. К ним относятся: ацидофильное молоко, ацидофилин, ацидофильно-дрожжевое молоко, ацидофильная паста, детские ацидофильные смеси, кисломолочные продукты с использованием бифидобактерий. Использование бактерий рода *Lactobacillus acidophilus* в производстве продуктов детского и диетического питания обусловлено наличием у них способности выделять специфические антибиотические вещества, подавляющие рост бактерий группы кишечной палочки, дизентерийной палочки, сальмонелл, коагулазоположительных стафилококков и др. Бактерицидные свойства ацидофильной палочки усиливаются в присутствии молочной кислоты. Основным пороком кисломолочных продуктов с использованием ацидофильных палочек является перекисание продукта. Это происходит в том случае, когда не проводят быстрого охлаждения продукта. Продукты, обогащенные бифидобактериями, характеризуются высокими диетическими свойствами, так как содержат ряд биологически активных соединений: свободные аминокислоты, летучие

жирные кислоты, ферменты, антибиотические вещества, микро- и макроэлементы.

7.1.3 Определение наличия посторонних микроорганизмов в заквасках и в кисломолочных продуктах

Контроль качества заквасок. Качество лабораторной и производственной заквасок на стерилизованном молоке контролируют по активности (предельной кислотности и продолжительности свертывания молока). В случае ее снижения проверяют чистоту закваски путем микроскопирования.

Качество производственной закваски на пастеризованном молоке контролируют по активности, микроскопическому препарату, кислотности, наличию БГКП и органолептическим свойствам сгустка. БГКП не допускаются в 10 см³ закваски.

Контроль кефирных грибковой и культуральной заквасок проводят по кислотности, наличию БГКП и микроскопическому препарату. В кефирных культуральных заквасках БГКП не допускаются в 3 см³.

Контроль чистоты закваски по микроскопическому препарату включает приготовление фиксированного препарата из закваски, окраски его краской Муромцева и микроскопирование его с объективом х90 в 10 полях зрения. При этом обращают внимание на наличие посторонних микроорганизмов, содержание которых в заквасках не допускается.

Наличие посторонних микроорганизмов в заквасках можно определить и посевом жидких заквасок на питательные среды.

Так, споровые формы бактерий определяют посевом заквасок, выдержанных при 85 °С в течение 10 минут, в стерильное молоко с добавлением парафина для выращивания в анаэробных условиях и без парафина – для культивирования споровых форм бактерий в аэробных условиях. Если после культивирования при 30 °С в течение 2-х суток в пробирках с парафином парафиновая пробка поднимается, а молоко пептонизируется, то это указывает на наличие в заквасках анаэробных споровых палочек рода *Clostridium*.

Наличие грибов и дрожжей определяют путем посева разведений закваски в чашки Петри с суслом-агаром или средой Сабуро с последующим культивированием при 24...26 °С в течение 3-5 суток.

Уксуснокислые бактерии определяют методом предельных разведений путем засева соответствующих разведений в стерильное обезжиренное молоко и термостатирования посевов при температуре 30°С в течение 3-5 суток. Учет результатов проводят по желтому кольцу, образующемуся на поверхности свернувшегося молока.

Микробиологический контроль производства кисломолочных продуктов заключается в проведении контроля технологического процесса, санитарно-гигиенического контроля условий производства и готовой продукции.

При контроле технологии проверяют эффективность пастеризации молока не реже 1 раза в 10 дней.

Особое внимание уделяют контролю качества заквасок на наличие бактерий группы кишечной палочки, отбирая пробы из трубопровода при подаче закваски в ванну. Исследуют также смесь после заквашивания и сквашивания. В последнем случае пробы отбирают из ванны, резервуара или бутылки при термостатном способе производства. Определяют наличие БГКП, которые не должны содержаться в 1 см³.

Контроль технологических процессов производства кисломолочных продуктов проводят один раз в месяц.

Готовую продукцию контролируют на наличие БГКП, а при необходимости – по микроскопическому препарату не реже одного раза в 5 дней. БГКП не допускаются в 0,1 см³ кефира, простокваши, йогурта, ацидофильно-дрожжевого молока и других кисломолочных напитков. В сметане 20%-ой и 25%-ой жирности БГКП не должны обнаруживаться в 0,01 см³, в твороге – в 0,001 г. В твороге нормируется также содержание золотистого стафилококка (не допускаются в 0,01 г). Патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы не допускаются в 25 см³ (г) всех видов кисломолочных продуктов.

При ухудшении микробиологических показателей готового продукта проводят дополнительный контроль технологических процессов для установления причин, влияющих на качество продукта.

7.2 ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

Студенты знакомятся с микрофлорой представленных к исследованию заквасок и кисломолочных продуктов (кефира, сметаны, творога, йогурта, варенца, ряженки и др.), готовят фиксированные из них мазки, окрашивают их краской Муромцева (см разд. 2.2.3) и микроскопируют с использованием иммерсионного объектива (x90) в 10 полях зрения.

Оформление и анализ результатов исследований

Студенты конспектируют теоретический материал. Рассматривают анализируемые продукты под микроскопом. При этом обращают внимание на качественный состав полезной микрофлоры и наличие посторонних микроорганизмов. Микроскопическую картину зарисовывают и под каждым рисунком делают вывод о качестве исследованного образца.

Контрольные вопросы

1. *Какими морфологическими признаками характеризуются молочнокислые стрептококки?*
2. *Что такое закваски? Из чего готовятся производственные закваски на молочных предприятиях?*

3. *Какими морфологическими признаками характеризуются молочнокислые палочки?*
4. *Перечислите группы кисломолочных продуктов в зависимости от состава микрофлоры заквасок.*
5. *Охарактеризуйте микрофлору продуктов,готавливаемых с использованием многокомпонентных заквасок. Какие это продукты?*
6. *Какие кисломолочные продукты получают с использованием мезофильных молочнокислых стрептококков? При какой температуре проводят сквашивание таких продуктов?*
7. *Какие продукты готовят с использованием ацидофильных палочек и бифидобактерий? В чем ценность этих продуктов?*
8. *Какие микроорганизмы входят в состав микрофлоры йогурта, ряженки, варенца?*
9. *Как осуществляют контроль наличия в заквасках и кисломолочных продуктах посторонних микроорганизмов путем микроскопии.*
10. *Какие микробиологические показатели определяют при контроле качества заквасок и кисломолочных продуктов?*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №8

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ДРОЖЖЕЙ

Цель работы: Ознакомиться с основными морфологическими, физиологическими и производственно-ценными свойствами культурных дрожжей. Изучить технически вредную микрофлору, сопутствующую производственным дрожжам. Освоить микробиологические методы контроля качества производственных дрожжей, применяемых в хлебопечении и бродильных производствах. Научиться определять концентрацию дрожжевых клеток в дрожжевой суспензии с помощью счетной камеры Горяева.

Оборудование и материалы: Микроскоп; бактериологические петли; предметные и покровные стекла; счетная камера Горяева; фильтровальная бумага; 96 % этиловый спирт; лоток с рельсами; промывалка.

Красители: метиленовая синь (1:40), синька Финка (раствор метиленовой сини 1:5000), карболовый фуксин Циля, 0,5 % спиртовой раствор йода; 5% раствор H_2SO_4 ; набор красок для окраски по методу Грама (бумажки, пропитанные генцианвиолетом, раствор Люголя; фуксин рабочий).

Водная суспензия производственных дрожжей, чистые культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces carlsbergensis* в пробирках на скошенном сусло-агаре.

8.1 КРАТКИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

8.1.1 Характеристика дрожжей, используемых в хлебопечении

и в бродильных производствах

Дрожжи, используемые в хлебопечении и в бродильных производствах, относятся к семейству сахаромикетов, роду *Saccharomyces*.

Дрожжи-сахаромикеты имеют овальную форму (см. рис. 6а), размножаются в производственных условиях почкованием, а в неблагоприятных условиях – аскоспорами.

Температурный оптимум для размножения дрожжей находится в пределах 25...30 °С. Низкие температуры дрожжи переносят хорошо, хотя размножение их приостанавливается (минимальная температура развития дрожжей 2...3 °С). При температуре 40 °С рост и развитие дрожжей прекращается, дрожжи отмирают.

Культурные дрожжи относятся к ацидофилам, т. е. развиваются в кислой среде, оптимальное значение рН для дрожжей 4,5...5,0. Являются факультативными анаэробами. В аэробных условиях они активно растут и размножаются, а в анаэробных – осуществляют спиртовое брожение (эффект Пастера).

Дрожжи чувствительны к высокой концентрации растворенных в среде веществ. При высокой концентрации сахара в среде жизнедеятельность дрожжей прекращается, так как при этом увеличивается осмотическое давление среды и наступает плазмолиз клеток. Величина предельной концентрации сахара для различных рас дрожжей неодинакова.

Различают дрожжи верхового и низового брожения. *Дрожжи верхового брожения* в стадии интенсивного брожения распределяются на поверхности сбраживаемой среды в виде довольно толстого слоя пены и остаются в таком состоянии до окончания брожения. К таким дрожжам относятся спиртовые и хлебопекарные дрожжи. *Дрожжи низового брожения*, развиваясь в сбраживаемой жидкости, не переходят в поверхностный слой – пену, быстро оседают по окончании брожения, образуя плотный слой на дне бродильной емкости. К дрожжам низового брожения относятся пивные дрожжи. Такие различия при сбраживании жидких сред дрожжами верхового брожения и дрожжами низового брожения обусловлены тем, что дрожжи верхового брожения принадлежат к *пылевидным дрожжам*, не склеивающимся друг с другом, а дрожжи низового брожения относятся к *хлопьевидным дрожжам*, так как имеют клейкие оболочки, что приводит к агглютинации и быстрому осаждению клеток.

Кроме общих свойств, дрожжи, используемые в том или ином производстве, обладают специфическими свойствами. Более того, в одном и том же производстве применяют разновидности, различающиеся по одной или нескольким технологическим особенностям. Разновидности дрожжей одного вида называют *расами*. Каждое производство располагает несколькими расами дрожжей. Основными технологическими особенностями различных рас являются величина клеток, способность сбраживать и утилизировать различные сахара.

Дрожжи, используемые в хлебопекарном производстве

Роль дрожжей в хлебопекарном производстве заключается в разрыхлении теста. Дрожжи сбраживают сахара муки и мальтозу, образующуюся из крахмала с выделением спирта и углекислого газа. При этом образуются побочные продукты (уксусный альдегид, бутиловый, изобутиловый, изоамиловый спирты, органические кислоты, ароматические вещества – диацетил и ацетоин, эфиры и др.), которые создают вкус и аромат хлеба.

При производстве пшеничного хлеба применяют дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, а при производстве ржаного хлеба – дрожжи двух видов *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces minor*, причем преобладают дрожжи второго вида. Дрожжи *Saccharomyces minor* отличаются более высокой кислотоустойчивостью, чем дрожжи первого вида, менее требовательны к источникам витаминного и азотного питания, более спиртоустойчивы.

Требования, предъявляемые к хлебопекарным дрожжам:

- Должны быть устойчивы к высоким концентрациям соли (до 3 – 4 %) и сахара в тесте;
- Должны хорошо размножаться при оптимальных значениях pH 4,5...5,0 и температуре 26...28 °C;
- Должны обладать высокой бродильной энергией (мальтазной и зимазной активностью). *Мальтазная активность* – это время (в мин), необходимое для выделения 10 см³ CO₂ при сбраживании 10...20 см³ мальтозы при 30 °C дрожжами, взятыми в количестве 2,5 % к объему среды. Мальтазная активность характеризует способность дрожжей гидролизовать мальтозу муки и зависит от активности содержащегося в дрожжах фермента мальтазы. Мальтазная активность дрожжей хорошего качества должна быть не более 100 мин. *Зимазная активность* – это время (в мин), необходимое для выделения 10 см³ CO₂ при сбраживании 10...20 см³ глюкозы при 30 °C дрожжами, взятыми в количестве 2,5 % к объему среды. Зимазная активность дрожжей хорошего качества должна быть не более 60 мин. О бродильной активности хлебопекарных дрожжей можно также судить по их *подъемной силе* – периоду времени (в мин), в течение которого тесто, замешанное на испытуемых дрожжах, поднимается до определенного уровня в формочке. Все эти показатели относятся к **технологическим показателям качества** хлебопекарных дрожжей;
- Должны быть стойкими к инфицированию при хранении в прессованном виде и в высушенном состоянии.

Дрожжи, используемые в бродильных производствах

Пивные дрожжи относятся к двум видам: *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces carlsbergensis*.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются дрожжами верхового брожения и в пивоварении используются редко, в основном для темных и специальных сортов пива. Эти дрожжи в производственных условиях сбраживают сусло при 12...15 °C.

Дрожжи *Saccharomyces carlsbergensis* относятся к дрожжам низового брожения и в производстве осуществляют главное брожение при 5...10 °C. Они

нашли широкое применение в пивоваренном производстве и используются для приготовления стандартного и сортового пива.

Требования, предъявляемые к пивным дрожжам:

- Должны обладать высокой бродительной активностью. Бродительная активность определяется степенью сбраживания сусла, т.е. отношением массы сброженного экстракта к массе сухих веществ (СВ) в начальном сусле;
- Должны обладать флокуляционной способностью, т.е. способностью медленно и полно оседать на дно бродительных аппаратов в конце главного брожения;
- Должны иметь умеренную способность к размножению. Очень активное размножение дрожжей нежелательно, т.к. при этом расходуются экстрактивные вещества сусла и образуется большое количество побочных продуктов. В среднем в процессе брожения биомасса дрожжей увеличивается в 3...4 раза;
- Должны быть стойкими к неблагоприятным условиям и инфицированию;
- Должны обладать стойкостью морфологических и физиологических свойств;
- Должны придавать пиву характерный вкус и аромат.

Спиртовые дрожжи. В спиртовом производстве применяют дрожжи вида *Saccharomyces cerevisiae*. Основными требованиями, предъявляемыми к расам дрожжей при производстве спирта являются:

- Высокая бродительная активность. Спиртовые дрожжи должны образовывать максимум спирта;
- Способность сбраживать как моносахара, так и дисахариды и некоторые декстрины;
- Способность сбраживать растворы, содержащие довольно большие концентрации сахара;
- Высокая кислотоустойчивость;
- Способность осуществлять спиртовое брожение при высоком содержании спирта в растворе.

8.1.2 Микрофлора производственных дрожжей

Культурные дрожжи должны быть стойкими к инфицированию. Тем не менее, посторонние микроорганизмы попадают в засевные производственные дрожжи при неправильном ведении технологического процесса, при недостаточно тщательной мойке и дезинфекции оборудования и коммуникаций, несоблюдении санитарного режима в отделении чистых культур и т.д.

Чаще всего производственным дрожжам сопутствуют молочнокислые, уксуснокислые бактерии и дикие дрожжи, которые, так же как и культурные дрожжи, используют сахара питательной среды в качестве основного источника питания, что снижает выход спирта. Эти микроорганизмы образуют органические кислоты и другие продукты, которые могут отрицательно влиять

на органолептические показатели готовой продукции (хлеба, пива) и бродильную активность культурных дрожжей. Хлебопекарные дрожжи, инфицированные посторонними микроорганизмами, имеют низкую ферментативную активность и стойкость.

Молочнокислые бактерии чаще других микроорганизмов встречаются в производственных дрожжах. Они принадлежат к трем родам: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*. Стрептококки и лейконостоки имеют шаровидную форму клеток. Стрептококки располагаются друг относительно друга попарно, короткими и длинными цепочками, а лейконостоки в основном попарно. Отличием этих двух родов друг от друга является то, что лейконостоки в отличие от стрептококков образуют слизистые капсулы. Лактобациллы являются палочковидными бактериями, которые в зависимости от вида могут располагаться поодиночке или короткими цепочками. Общими признаками этих бактерий являются грамположительная окраска, отсутствие спорообразования, каталазу они не образуют, не восстанавливают нитраты в нитриты, являются факультативными анаэробами. Молочнокислые стрептококки хорошо развиваются в средах, содержащих 3...6 % спирта, а палочковидные формы молочнокислых бактерий не теряют своей активности даже при 10...12 % спирта.

Уксуснокислые бактерии относятся к двум родам *Acetobacter* и *Gluconobacter*. В производстве пива чаще всего встречаются бактерии вида *A. aceti*. Для этих бактерий характерна чрезвычайная изменчивость формы клеток – от эллиптических до палочковидных, прямых или слегка изогнутых. Грамотрицательные, спор не образуют, некоторые виды имеют слизистую капсулу. При росте в жидкой среде образуют пленки беловатого или сероватого цвета. Реакция на каталазу положительная. Аэробы. Оптимальное значение pH 5,4-6,3, но могут расти и при pH 4,0-4,5. Эти бактерии устойчивы к антисептическим веществам хмеля, высокой кислотности, толерантны к спирту. Некоторые виды выделяют соединения, токсичные для дрожжей.

В пивоваренном производстве в засевных производственных дрожжах очень часто встречаются **пивные сарцины** (род *Pediosoccus*). Сферические клетки (кокки) в парах, чаще в тетрадах или пакетах. Бесспоровые, грамположительны. Факультативные анаэробы. Каталазоотрицательные. Мезофилы. Оптимальное значение pH 4,5-5,0. Могут развиваться при содержании спирта до 8%. Лучше всего растут в присутствии дрожжей. Пивные сарцины вызывают сильное помутнение пива, сначала опалисцирующее, а затем с появлением мелкозернистого осадка. Иногда происходит увеличение вязкости пива и даже его ослизнение. Вследствие образования диацетила эти бактерии придают пиву характерный прогорклый маслянистый вкус и медовый аромат. Диацетил также отрицательно влияет на рост и размножение производственных дрожжей, ускоряет их оседание и отмирание. Развитие педиококков стимулирует образование продуктов распада белков, а также тиамина и рибофлавина, синтезируемых дрожжами.

Дикие дрожжи инфицирующие производственные дрожжи принято подразделять на две группы:

- Дикие дрожжи, принадлежащие к роду *Saccharomyces*;
- Дикие дрожжи, не принадлежащие к роду *Saccharomyces*.

При попадании в сусло на стадии брожения дикие дрожжи не могут интенсивно развиваться, так как их рост подавляется культурными дрожжами, количество которых по сравнению с содержанием инфицирующих пиво диких дрожжей значительно больше.

Дикие дрожжи, принадлежащие к роду Saccharomyces

В чаще всего встречаются следующие разновидности диких дрожжей-сахаромицетов: *S. diastaticus*, *S. pastorianum*, *S. bayanus*, *S. ellipsoideus*. В настоящее время все эти дрожжи принято относить к одному виду *Saccharomyces cerevisiae*, так как с точки зрения систематики различия в их признаках не являются существенными для разграничения видов. Клетки этих дрожжей имеют овальную или эллиптическую форму. Размножаются в основном почкованием, но могут и спорообразованием. Факультативные анаэробы. Активно сбраживают сахара. Оптимальная температура развития 27-35 °С, pH – от 3,5 до 5,0.

Дикие дрожжи, не относящиеся к роду Saccharomyces

Из производственных дрожжей выделены следующие дрожжи этой группы: дрожжи родов *Candida*, *Torulopsis*, *Pichia*, *Hansenula*, *Brettanomyces*, *Rhodotorula* и др.

Дрожжи рода *Candida* имеют круглые, овальные или яйцевидные, а иногда удлинённые или неправильные формы клеток. Морфология клеток непостоянна и существенно меняется в зависимости от условий культивирования и питательной среды. Спор не образуют. На жидких средах развиваются преимущественно на поверхности в виде белой или сероватой пленки. Некоторые виды являются факультативными анаэробами, а другие – аэробами. Размножению большинства видов способствует присутствие в среде кислорода. Некоторые дрожжи этого вида продуцируют специфический белок, губительно воздействующий на культурные дрожжи (дрожжи-убийцы).

Дрожжи родов *Pichia* и *Hansenula* имеют клетки различной формы – от круглых и овальных до сильно вытянутых, иногда изогнутых. Многие виды образуют псевдомицелий. Образуют споры. Большинство видов – аэробы, некоторые виды относятся к факультативным анаэробам. Размножению способствует присутствие кислорода.

Дрожжи рода *Rhodotorula* обычно круглой, овальной, яйцевидной или удлинённой формы. Спор не образуют.

Дрожжи рода *Torulopsis* (пивная торула) имеют круглую или овальную форму. Спор не образуют, плохо сбраживают сахара. Основным источником попадания этих микроорганизмов в производство является воздух.

Дрожжи рода *Brettanomyces* имеют клетки эллиптические, а также цилиндрические, удлинённо-продолговатые, нередко стрелозаостренные с одного конца. Образуют псевдомицелий. Спор не образуют. Являются факультативными анаэробами. Плохо сбраживают сахара. На жидких средах образуют хлопьевидный или вязкий осадок, могут образовывать тонкую пленку. Многие виды устойчивы к высоким концентрациям спирта.

Помимо вышеперечисленных групп микроорганизмов, инфицирующих производственные дрожжи, в них могут присутствовать **гнилостные бактерии**. Это спорообразующие грамположительные бациллы и клостридии и грамотрицательные не образующие спор палочковидные бактерии. Гнилостные бактерии вызывают распад белковых веществ. В аэробных условиях они осуществляют полную минерализацию белка, вплоть до диоксида углерода, аммиака, сероводорода, воды и минеральных солей. В анаэробных условиях гнилостные бактерии образуют различные органические дурнопахнущие и ядовитые вещества. Особую опасность представляют маслянокислые бактерии (*Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium saccharobutyricum* и др.) и нитрифицирующие бактерии (например, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*). Маслянокислые бактерии образуют масляную кислоту, а нитрифицирующие бактерии превращают нитраты в нитриты. Эти соединения даже в очень малых концентрациях (0,0005 %) подавляют развитие культурных дрожжей.

Биологическая чистота является одним из самых важных показателей качества производственных дрожжей. Особое значение этот показатель имеет в пивоваренном производстве. Это связано с тем, что в пивоварении засевные производственные дрожжи используются в нескольких производственных циклах (до 10..12 генераций) и поэтому являются основным источником попадания в производство микроорганизмов-вредителей, вызывающих прокисание, помутнение, образование осадка в пиве и придающих продукту неприятные вкус и аромат. Биологическая чистота пивных дрожжей считается удовлетворительной, если в них содержится не более 1 % бактерий и не более 0,5 % диких дрожжей.

8.1.3 Микробиологический контроль качества производственных дрожжей

В пивоваренном производстве при контроле засевных дрожжей основным методом исследования является их *микроскопирование*. При микроскопировании дрожжевой суспензии определяют морфологическое состояние дрожжей, способность дрожжей к размножению, процентное содержание мертвых клеток, наличие посторонних микроорганизмов, содержание в дрожжах запасных питательных веществ (гликогена и волютина). В дрожжах хорошего качества морфологическое состояние должно быть удовлетворительным. Процентное содержание почкующихся клеток - высокое (40...70%), дрожжей, содержащих гликоген должно быть не менее 70...75%; биологическая чистота - удовлетворительная (не более 1% бактерий и 0,5% диких дрожжей), количество мертвых клеток – не более 5% . В дрожжах чистой культуры должны отсутствовать посторонние микроорганизмы и мертвые дрожжевые клетки. В засевных производственных дрожжах целесообразно также определять концентрацию дрожжевых клеток. Это исследование проводят с использованием счетной камеры Горяева.

Определение биологической чистоты дрожжей ведут также *путем посева* разведение из дрожжевой суспензии *плотные питательные среды*. Количество

инфицирующих бактерий в засевных дрожжах определяется с использованием сусло-агара или дрожжевого агара с 1% глюкозы с мелом и антибиотиками (нистатином или актидионом). Для обнаружения диких дрожжей рода *Saccharomycetes* исследуемые пробы прогревают при 50 °С в течение 20 мин, а затем высевают на агар с ацетатом. В качестве селективных сред для этих дрожжей можно также использовать агар с кристаллвиолетом, сусло с 2% винной кислоты или 10% раствор глюкозы с 4% винной кислоты. Дрожжи, не относящиеся в роду *Saccharomycetes*, определяют на синтетической среде с лизином. Рецептуры этих сред приведены в приложении 2.

В производстве спирта засевные производственные дрожжи регулярно просматривают под микроскопом, что дает возможность следить за их размножением, морфологическим и физиологическим состоянием, а также степенью загрязнения посторонними микроорганизмами. В засевных дрожжах количество почкующихся клеток должно быть не более 3%. Так как производственные дрожжи готовятся в не стерильных условиях, в них может присутствовать некоторое количество бактерий. О инфицировании засевных дрожжей кислотообразующими бактериями (молочнокислыми, уксуснокислыми) свидетельствует повышение титруемой кислотности более чем на 0,05 град. В сильно инфицированных дрожжах могут быть подвижные спорообразующие бактерии, распознавание которых осуществляют путем окраски раствором йода (маслянокислые бактерии при этом окрашиваются в серо-голубой цвет). Обращают также внимание на наличие диких дрожжей, количество мертвых клеток (не более 5%). Учитывают также упитанность дрожжей по гликогену - в нормальных дрожжах гликоген занимает от 1/3 до 2/3 объема клетки. Если гликогена меньше 1/4 объема клетки, его содержание считается недостаточным.

Путем микроскопирования определяют также процентное содержание мертвых и почкующихся клеток и концентрацию дрожжевых клеток в бражке. Значения этих показателей в процессе брожения меняется. Так, в первые часы брожения концентрация дрожжевых клеток в бражке составляет 100 – 150 млн./см³, почкующихся клеток – 10...12%, мертвых – до 3...4%. В дальнейшем концентрация дрожжевых клеток и процентное содержание мертвых клеток увеличивается, а относительное содержание почкующихся клеток уменьшается.

Для установления степень инфицирования бражки посторонними микроорганизмами ее исследуют под микроскопом не реже 3 раз в сутки (из каждого бродильного аппарата). В первые часы брожения посторонние микроорганизмы должны отсутствовать, в период главного брожения допускается наличие единичных клеток, а при дображивании – 3...5 клеток посторонних микроорганизмов в поле зрения микроскопа.

Микробиологический контроль **хлебопекарных прессованных дрожжей** включает:

- **Микроскопирование.** При микроскопировании оценивают качество прессованных дрожжей – по величине, по однородности клеток и по наличию посторонних микроорганизмов (бактерий, диких дрожжей), процентному содержанию мертвых клеток.

- *Определение процентного содержания сахаромецетов и посторонних микроорганизмов с использованием плотных питательных сред* проводят в случае резкого ухудшения подъемной силы и при снижении стойкости прессованных дрожжей. Упрощенный метод – посев на сусло-агар с мелом (подсчитывают общее количество выросших на среде колоний и отдельно - колонии кислотообразующих бактерий, вокруг которых имеются зоны растворения мела). Усложненный метод – посев на несколько элективных питательных сред для выявления количества клеток посторонних микроорганизмов и распределения их по группам. В качестве элективных сред используют сусло-агар (8 % СВ) – для определения общего количества дрожжей и грибов; сусло-агар (12 % СВ) с мелом и нистатином (для определения молочнокислых бактерий); среда 10 на дрожжевой воде (для определения слизиобразующих бактерий – лейконостоков); молочный агар с нистатином (для определения гнилостных бактерий); дрожжевой агар с 4 % сахарозы и нистатином (для определения общего количества бактерий); синтетическая среда с лизином (для определения несовершенных дрожжей) и др. Состав этих сред и особенности их приготовления приведены в приложении 2. Общее количество дрожжей принимают за 100 % и определяют процентное содержание посторонних видов дрожжей, грибов и бактерий. В доброкачественных прессованных дрожжах допускается присутствие кислотообразующих бактерий не более 15...35 %, гнилостных дрожжей быть не должно, посторонних (диких) дрожжей – не более 30 %.

8.2 ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

На занятии студенты знакомятся с морфологическими, физиологическими и производственно-ценными свойствами культурных дрожжей и изучают свойства посторонних микроорганизмов, инфицирующих производственные дрожжи. Знакомятся с методами оценки качества производственных дрожжей. Путем микроскопирования определяют основные показатели качества дрожжей. Определяют концентрацию дрожжевых клеток методом прямого счета с использованием счетной камеры Горяева.

8.2.1 Определение биологической чистоты дрожжей

Готовят фиксированных мазок из густой дрожжевой суспензии. Окрашивают его по Гаму (разд.3.2.1) или простым методом (разд. 2.2.3). Далее препарат микроскопируют в иммерсионной системе с использованием объектива х90. Рассматривают препарат в 10 полях зрения. При микроскопировании обращают внимание на наличие посторонних бактерий и диких дрожжей (морфологические свойства бактерий и диких дрожжей, инфицирующих производственные дрожжи описаны в разд. 8.1.2).

Определение биологической чистоты можно также вести путем приготовления препарата «раздавленная капля» с использованием фазово-контрастного микроскопа. В этом случае на предметное стекло наносят каплю дрожжевой суспензии и добавляют каплю 10% раствора КОН или 50%

уксусной кислоты для растворения белков и жировых частиц, что облегчает просмотр препарата. Далее накрывают препарат покровным стеклом и микроскопируют с объективом х40 и рассматривают в 20 полях зрения. В поле зрения должно быть около 50 клеток дрожжей.

8.2.2 Определение морфологического состояния дрожжей

Ведут путем микроскопирования препарата «раздавленная капля» в затемненном поле зрения микроскопа с объективом х40. Для этого на предметное стекло наносят каплю разбавленной дрожжевой суспензии и накрывают ее покровным стеклом. Излишки воды удаляют фильтровальной бумагой.

При микроскопировании обращают внимание на форму, размеры клеток, толщину оболочек, структуру цитоплазмы, наличие почкующихся клеток.

Дрожжи должны иметь форму и размеры, соответствующие применяемой расе. Клетки должны быть равномерной величины, с тонкой оболочкой, однородной или мелкозернистой цитоплазмой, небольшими вакуолями. Количество почкующихся клеток в засевных дрожжах, используемых в пивоварении должно составлять 40...70%. Наличие большого количества морфологически измененных клеток свидетельствует о дегенерации культуры, поэтому такие дрожжи использовать в производстве не рекомендуется. Зернистая цитоплазма, крупные вакуоли и отсутствие почкующихся клеток характеризует старую культуру.

8.2.3 Определение процентного содержания мертвых клеток

На предметное стекло наносят каплю разбавленной дрожжевой суспензии и каплю раствора синьки Финка (раствор метиленового синего концентрацией 1:5000). Через 2 мин препарат накрывают покровным стеклом, излишки воды убирают с помощью фильтровальной бумаги. Микроскопирование ведут в 5 полях зрения. При этом подсчитывают количество всех дрожжевых клеток, а также отдельно считают количества мертвых (окрашенных в синий цвет) клеток. Далее рассчитывают процентное содержание мертвых клеток.

Определение мертвых клеток в дрожжевой суспензии можно проводить и с помощью водного раствора красителя нейтрального красного в концентрации 1:10000. При этом мертвые клетки окрашиваются в красный цвет, а в живых клетках окрашиваются только включения цитоплазмы. При окрашивании дрожжевой суспензии раствором нейтрального красного микроскопирование ведут через 15 мин после окраски.

8.2.4 Определение запасных веществ (гликогена, волютина) в клетках дрожжей

Основными запасными веществами дрожжевой клетки являются гликоген и волютин (зерна метакроматина).

Гликоген – запасной полисахарид дрожжевой клетки. По содержанию гликогена судят об упитанности дрожжей. Если гликогена в дрожжах мало, то

это свидетельствует о том, что они длительное время находились без питательного субстрата и имеют поэтому низкую бродильную активность.

Волютин – запасной полифосфат в соединении с простыми белками и рибонуклеиновой кислотой. В состоянии активного обмена волютин в клетках дрожжей располагается мелкими каплями по стенкам вакуолей или непосредственно под клеточной стенкой. В больших количествах волютин накапливается перед почкованием. Накопление волютина особенно интенсивно происходит при выращивании дрожжей на средах, богатых фосфатами.

8.2.4.1 Определение гликогена

Для определения гликогена на предметное стекло наносят каплю разбавленной дрожжевой суспензии и каплю 0,5% раствора йода. Через 2...3 мин цитоплазма клеток окрашивается в светло-желтый цвет, а гранулы гликогена – в красно-бурый. Препарат накрывают покровным стеклом и удаляют излишек жидкости фильтровальной бумагой и микроскопируют с объективом х40.

8.2.4.2 Определение волютина методом Омелянского

1. Готовят фиксированный мазок из густой дрожжевой суспензии;
2. Препарат в течение 30...60 сек окрашивают раствором фуксина Циля;
3. Препарат промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой;
4. Мазок обрабатывают 1%-ным раствором H_2SO_4 в течение 20...30 сек, при этом клетки обесцвечиваются, а волютин, так как он устойчив к действию кислот, сохраняет окраску;
5. Препарат промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой;
6. Дополнительно докрашивают мазок метиленовым синим (1:40) в течение 15...30 сек, промывают его водой и подсушивают фильтровальной бумагой;
7. Препарат микроскопируют в иммерсионной системе с объективом х90.

Микроскопическая картина: гранулы волютина красного цвета, клетки – синего.

8.2.5 Определение концентрации дрожжевых клеток с помощью счетной камеры Горяева

Для подсчета клеток в дрожжевой суспензии используют счетные камеры Горяева, Тома-Цейса, Бюркера и др.

Счетная камера Горяева (рис. 15) представляет собой толстое предметное стекло, разделенное четырьмя прорезями на три поперечно расположенные площадки. Центральная площадка продольной прорезью делится пополам. На каждой половинке выгравирована микроскопическая сетка. Сетка разделена на большие и малые квадраты: площадь большого квадрата равна $1/25 \text{ мм}^2$, малого – $1/400 \text{ мм}^2$. Боковые площадки расположены на 0,1 мм выше центральной (глубина камеры) и служат для притирания покровного стекла.

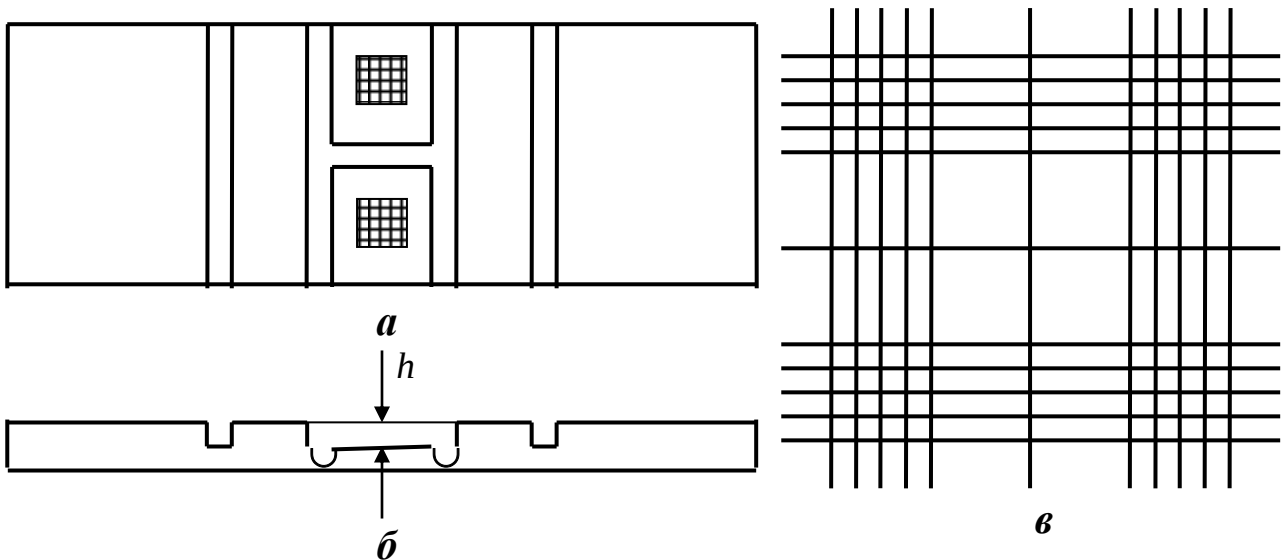


Рис. 15 Счетная камера Горяева: *а* – вид сверху; *б* – вид сбоку; *в* – деление камеры на квадраты; *h* – глубина камеры

При работе с камерой необходимо соблюдать определенный порядок ее заполнения. Вначале углубление с сеткой покрывают специальным шлифованным покровным стеклом и, слегка прижимая, смещают покровное стекло в противоположные стороны до появления колец Ньютона. Это указывает на то, что покровное стекло притерто к сторонам камеры. После этого заполняют камеру исследуемой дрожжевой суспензией. Суспензию вносят через бороздки камеры капилляром или пипеткой. Подсчет клеток производят через 3...5 мин после заполнения камеры, чтобы клетки осели и при микроскопировании были видны в одной плоскости.

Камеру помещают на предметный столик и рассматривают в затемненном поле зрения с объективами вначале на $\times 8$, а затем на $\times 40$. Клетки подсчитывают в 10 больших или в 20 маленьких квадратах, перемещая их по диагонали. Учитывают все клетки, лежащие в квадрате сетки и на пограничных линиях, если они больше, чем наполовину лежат внутри квадрата. Клетки, пересеченные пограничной линией пополам, считают только на двух их четырех сторон квадрата. При подсчете количество клеток в большом квадрате не должно превышать 20...30, а в малом - 10, в противном случае делают разведение.

Количество клеток в 1 см^3 исследуемой суспензии вычисляют по формуле:

$$M = a \cdot n \cdot 10^3 / S \cdot h,$$

где M – число клеток в 1 см^3 дрожжевой суспензии;

a – среднее число клеток в квадрате сетки;

n – разведение дрожжевой суспензии (если оно применялось);

S – площадь квадрата сетки, мм^2 ;

h – глубина камеры.

Пример: При подсчете взвеси дрожжей в камере Горяева обнаружено 20 дрожжевых клеток в одном большом квадрате. Густая взвесь предварительно была разведена 1:100. Следовательно, $M = 20 \cdot 1000 \cdot 25 \cdot 100 / 0,1 = 5,0 \cdot 10^8$ кл/см³.

Оформление и анализ результатов исследований

Студенты конспектируют теоретический материал и методы микроскопического исследования производственных дрожжей. Определяют биологическую чистоту дрожжей, их морфологическое состояние, концентрацию мертвых и почкующихся клеток, наличие гликогена и волютинина. Подсчитывают концентрацию дрожжевых клеток с помощью камеры Горяева. Микроскопическую картину, отражающую морфологическое состояние дрожжей зарисовывают. Делают вывод о качестве исследованных дрожжей используя данные, представленные в разделе 8.1.3.

Контрольные вопросы

1. Охарактеризуйте морфологические и физиологические свойства дрожжей – сахаромицетов.
2. В чем отличие дрожжей верхового брожения от дрожжей низового брожения?
3. В каких производствах используются дрожжи верхового брожения, а в каких – низового брожения?
4. Какие дрожжи используются в производстве пшеничного и ржаного теста? Перечислите требования, предъявляемые к хлебопекарным дрожжам.
5. Какими производственно-ценными свойствами должны обладать пивные дрожжи?
6. Дрожжи какого вида используются в производстве спирта? Каким требованиям должны удовлетворять спиртовые дрожжи?
7. Какие микроорганизмы чаще всего инфицируют производственные дрожжи? Каким образом можно определить посторонние микроорганизмы в производственных дрожжах?
8. Какие микробиологические показатели определяются при контроле качества засевных производственных дрожжей в пивоваренном производстве, в производстве спирта? Как осуществляют микробиологический контроль хлебопекарных дрожжей?
9. Как определить концентрацию клеток в дрожжевой суспензии?
10. Как и для чего определяется гликоген в клетках дрожжей?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №9

САНИТАРНО-ГИГИЕНИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ УСЛОВИЙ ПРОИЗВОДСТВА

(выполняется на двух занятиях)

Цель работы: Ознакомиться с организацией санитарно-гигиенического контроля на предприятиях пищевой промышленности. Освоить

микробиологические методы, позволяющие оценить санитарное состояние воды, воздуха производственных помещений, оборудования, тары, упаковочных и вспомогательных материалов, рук и спецодежды работников.

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

9.1. КРАТКИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

9.1.1 Организация санитарно-гигиенического контроля на предприятиях пищевой промышленности

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

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

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

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

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

Внутриведомственный санитарный контроль осуществляют ведомственная санитарная служба и заводская лаборатория. Они контролируют выполнение требований СанПиНа для предприятий пищевой промышленности, регулярно следят за санитарным состоянием производства, за профилактическими обследованиями работников цехов и соблюдением ими

правил личной гигиены. Результаты проведения санитарно-гигиенического контроля фиксируются в специальном журнале.

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

Оценка санитарного состояния воздуха производственных помещений

Воздух производственных помещений может стать источником микробного загрязнения молочных продуктов.

Санитарно-гигиеническая оценка воздуха производственных помещений проводится по двум микробиологическим показателям: общей бактериальной обсемененности (КМАФАнМ) и содержанию санитарно-показательных микроорганизмов – гемолитических стрептококков и стафилококков. Воздух производственных помещений считается чистым, если КМАФАнМ не превышает 1500 КОЕ/м³, а гемолитических стрептококков и стафилококков не более 16 в 1 м³. В качестве питательных сред используют мясопептонный агар (для определения КМАФАнМ) и кровяной агар (для определения гемолитических стрептококков и стафилококков).

Для определения микроорганизмов в воздухе используют седиментационный и аспирационный методы.

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

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

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

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

Оценка санитарного состояния воды

Вода, используемая на предприятиях пищевой промышленности, должна отвечать требованиям СанПиН 2.1.4.1074-01 на питьевую воду.

Для оценки санитарного состояния воды в ней определяют общее микробное число – не более 50 КОЕ/см³; термотолерантные колиформные бактерии – не допускаются в 100 см³; общие колиформные бактерии также должны отсутствовать в 100 см³; споры сульфитредуцирующих клостридий - не допускаются в 20 см³; колифаги – в 100 см³. Исследование питьевой воды проводят один раз в квартал при пользовании городским водопроводом и один раз в месяц при наличии собственных источников водоснабжения в воде.

Общее микробное число воды (ОМЧ) – количество мезофильных аэробных и факультативноанаэробных микроорганизмов, способных образовывать колонии на питательном агаре при 37 °С в течение 24 часов.

К общим колиформным бактериям относятся грамотрицательные не образующие спор палочки, не обладающие оксидазной активностью, ферментирующие лактозу или маннит с образованием альдегида, кислоты и газа при температуре 37°С в течение 24 часов.

Термотолерантные колиформные бактерии обладают всеми признаками общих колиформных бактерий, которые, кроме этого способны ферментировать лактозу до кислоты и газа при температуре 44 °С в течение 24 часов.

Сульфитредуцирующие клостридии (преимущественно *Clostridium perfringens*) – спорообразующие анаэробные палочковидные бактерии, редуцирующие сульфит натрия на железо-сульфитном агаре в течение 24 часов при температуре 44 °С.

Колифаги – бактериальные вирусы, способные лизировать кишечную палочку и формировать зоны лизиса через 18±2 часа при температуре 37 °С на ее газоне на питательном агаре. Колифаги – индикаторы очистки питьевой воды в отношении энтеровирусов.

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

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

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

Для проведения исследования готовят ватные или марлевые тампоны, которые закрепляют на деревянном или металлическом стержне и помещают в пробирки с 10 см³ воды. Пробирки с тампонами стерилизуют в автоклаве при 0,1 МПа в течение 20-30 минут. Смывы с крупного оборудования и аппаратов берут с помощью нержавеющей металлических трафаретов с вырезанной серединой (площадь выреза 10, 25 или 100 см³). Перед взятием пробы трафарет смачивают спиртом, обжигают и накладывают на исследуемую поверхность. Ограниченную поверхность промывают смоченным тампоном, затем тампон погружают в пробирку с водой и содержимое хорошо перемешивают. В смывной воде определяют общую бактериальную обсемененность и наличие кишечной палочки (путем посева на МПА и среду Кесслера). В смывах с хорошо вымытого оборудования общее количество микроорганизмов в смывной воде не должно превышать их содержания в чистой воде, поступающей на мойку. Кишечные палочки должны в смыве отсутствовать. Количество слизеподобных бактерий не должно быть более 0-5 в 1 мл смыва.

Наличие кишечной палочки можно определить, используя среду Кода. В этом случае тампоном, смоченным в среде Кода, промывают исследуемую поверхность. Далее тампон погружают в среду, а пробирку помещают в термостат с температурой 42⁰С на 18-24 часа. О наличии кишечной палочки судят по изменению цвета среды с зеленого до желтого.

Контроль трубопроводов, рукавов, шлангов

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

Качество мойки трубопроводов можно также оценить путем отбора 10 мл смывной воды в стерильную посуду с последующим центрифугированием при 1500-2000 об/мин в течение 10 минут и микроскопированием осадка в 10 полях зрения. При этом должно обнаруживаться не более 5-6 клеток микроорганизмов.

Контроль посуды и инвентаря

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

Контроль вспомогательных и упаковочных материалов

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

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

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

Контроль чистоты рук и спецодежды работников

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

Перед анализом тампон смачивают стерильной водой или физиологическим раствором и обтирают им обе руки и пальцы каждого работника. Тампон ополаскивают в воде, в которой проводилось его смачивание, хорошо взбалтывают, отбирают 1 мл и подготавливают разведения (1:10 и 1:100). Для определения общего количества микроорганизмов в 1 мл смыва производят посев разведений на МПА в стерильные чашки Петри и далее проводят термостатирование при 37 °С в течение 48 часов. Остаток смыва вместе с тампоном высевает в 5 см³ среды Кесслера или Кода, а затем проводят культивирование при температуре 42-43 °С в течение 18-24 часов. Наличие в смыве кишечной палочки недопустимо.

Можно применить и такой метод: в сложенные ладонями вместе кисти рук наливают 100 мл стерильной воды так, чтобы вода хорошо промыла пальцы. Стерильным тампоном протирают ладони и ногти. Воду собирают в стерильную склянку и туда же бросают тампон. Смывную воду перемешивают и производят аналогичные высевы. Чистоту рук оценивают по количеству микроорганизмов в 1 мл смыва при отсутствии кишечных палочек:

*Количество микроорганизмов
в 1 мл смыва с рук*

До 1000
1000-5000
5000-10000
Свыше 10000

Оценка чистоты

Отлично
Хорошо
Удовлетворительно
Плохо

Периодически проводят контроль обработки рук хлорной известью, для чего отдельные участки рук протирают ватным тампоном, смоченным йодкрахмальным раствором (смесь растворов - 6% раствора йодистого калия и 4% раствора растворимого крахмала в равных соотношениях). Если тампон и

поверхности рук в местах соприкосновения с тампоном окрашиваются в синевато-бурый цвет, то это свидетельствует о присутствии ионов хлора.

Чистоту рук можно проверить также с помощью индикаторных бумажек для определения бактерий группы кишечной палочки. Для этого индикаторную бумажку смачивают в стерильной воде и накладывают на руку. Затем бумажку помещают в пакет, запаивают и термостатируют в течение 12 часов при 37°C. Появление розовых пятен свидетельствует о присутствии БГКП.

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

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1-е занятие

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

9.2.1 Микробиологическое исследование воздуха седиментационным методом

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

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

Чашки оставляют открытыми 5, 10 или 15 минут (время экспозиции) в зависимости от загрязненности воздуха. Затем их закрывают крышками, переворачивают вверх дном и помещают в термостат. Чашки с МПА выдерживают в течение 24-48 часов при 37°C, а со средой Сабуро – в течение 2-3 суток при 25°C.

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

Формула Омелянского:

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

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

S – площадь чашки Петри, см^2 ;

T – время экспозиции, мин;

100 – пересчет площади чашки на 100 см^2 ;

5 – время экспозиции по Омелянскому, мин;

100 – пересчет на 1 м^3 воздуха.

9.2.2 Микробиологическое исследование воды

Отбор проб

Кран или край спускной трубы обжигают зажженным ватным тампоном, пропитанным спиртом. Открывают кран и в течение 10-15 минут воду спускают, после чего производят отбор пробы в стерильную колбу (объем пробы не менее 500 см^3). Колбу закрывают ватно-марлевой пробкой над огнем.

9.2.2.1 Определение общего микробного числа (КМАФАнМ)

Проводят по методике, описанной в разделе 2.2.2.1.

Для посева отбирают по 1 см^3 воды и переносят в 2 чашки Петри и заливают расплавленной и охлажденной до $45...50^\circ\text{C}$ плотной питательной средой (МПА). После инкубации посевов подсчитывают количество колоний в каждой чашке, а затем результаты суммируют и делят на два.

9.2.2.2 Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий методом мембранных фильтров

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

Для анализа точно отмеряют 100 см^3 воды и фильтруют этот объем через стерильный мембранный фильтр. После окончания фильтрования фильтр осторожно приподнимают фламбированным пинцетом и переносят в чашку Петри со средой Эндо. Поверхность фильтра с осевшими на ней микроорганизмами должна быть обращена вверх. Чашки с фильтрами ставят в термостат дном вверх и инкубируют посевы при температуре 37°C в течение 24 часов.

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

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

Для идентификации отбирают не менее 5 колоний каждого вида и делают посев на скошенный питательный агар. Посевы инкубируют при 37⁰С в течение 16-18 часов. Далее проводят биохимические тесты с чистыми культурами: оксидазный тест и тест образования кислоты и газа при ферментации лактозы при температуре 37⁰С для определения общих колиформных бактерий и при 44⁰С при определении термотолерантных колиформных бактерий.

9.2.2.3 Определение содержания общих и термотолерантных колиформных бактерий титрационным методом

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

Титрационный метод может быть использован:

- при отсутствии материалов и оборудования, необходимых для выполнения анализа методом бродильных проб;
- при анализе воды с большим содержанием взвешенных частиц;
- в случае преобладания в воде посторонней микрофлоры, препятствующей получению на фильтрах изолированных колоний общих колиформных бактерий.

Первый этап исследования заключается в посеве 3-х объемов воды по 100 см³ в концентрированную лактозопептонную среду. Посевы инкубируют при температуре 37⁰С в течение 24-48 часов для определения общих колиформных бактерий и при 44⁰С – при определении термотолерантных колиформных бактерий в течение 24±2 часов. Если в колбах не обнаружены признаки роста (об этом судят по отсутствию газа в поплавках) то колиформные бактерии отсутствуют в 100 см³.

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

9.2.2.4 Определение споровых сульфитредуцирующих клостридий прямым посевом

Из каждой пробы воды делают посев 20 см³ в железосульфитный агар. Для этого в стерильные пробирки вносят по 10 см³ в 2 пробирки объемом 30 см³ или по 5 см³ в 4 пробирки вместимостью 15 см³. Посевы заливают горячим (75...80⁰С) железосульфитным агаром в количестве, превышающем объем воды в 2 раза. Среду заливают по стенке пробирки, избегая образования пузырьков воздуха. После этого пробирки быстро охлаждают, помещая их в емкость с холодной водой для создания анаэробных условий. Посевы инкубируют при 44

$^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ± 2 часов. Если после культивирования не наблюдается почернения среды в пробирках, то считают, что сульфитредуцирующие клостридии отсутствуют в 20 см^3 .

9.2.3 Исследование чистоты рук

Закрепленный на деревянном или металлическом стержне стерильный тампон смачивают стерильной водой (или физиологическим раствором) и протирают ими ладони, тыльную поверхность рук, под ногтями и между пальцами обеих рук. Тампон погружают в пробирку с водой, в которой проводилось смачивание, содержимое пробирки хорошо взбалтывают, отбирают 1 см^3 и готовят разведения (1:10 и 1:100).

Для определения КМАФАнМ проводят посев разведений в чашки Петри на мясопептонный агар с последующим термостатированием при 37°C в течение 48 часов. Остаток смыва вместе с тампоном высевает в пробирки с 5 см^3 среды Кесслера и проводят культивирование при 43°C в течение 24 часов.

Учет результатов исследований. Чистоту рук оценивают по количеству микроорганизмов в 1 см^3 смыва при отсутствии газообразования в пробирке со средой Кесслера с поплавком (при отсутствии кишечной палочки). При оценке состояния рук по содержанию в смывной воде мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) руководствуются описанием, изложенным в разделе 4.1.4 данной лабораторной работы.

2-е занятие

На втором занятии студенты исследуют:

- **посевы воздуха на мясопептонном агаре и на среде Сабуро.** Подсчитывают количество выросших колоний и по формуле Омелянского (раздел 4.2.1.) определяют количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, содержание грибов и дрожжей в 1 м^3 воздуха. Определение качественного состава микрофлоры воздуха проводят по методикам, описанным в разделах 2.2.4 и 2.2.5. На основании результатов исследований делаются выводы о санитарном состоянии и качественном составе микрофлоры воздуха.
- **посевы водопроводной воды на мясопептонном агаре и среде Кесслера.** Подсчитывают количество выросших колоний на мясопептонном агаре. Если в чашках выросло более 50 колоний, то санитарное состояние воды неудовлетворительное. Внимательно рассматривают посевы воды на жидкой накопительной среде (лактозо-пептонной среде или среде Кесслера). Если на среде есть рост, то лаборанты к занятию делают пересев на среду Эндо. Студенты рассматривают посевы в чашках Петри на среде Эндо и при наличии типичных колоний готовят фиксированные мазки, окрашивают их

по Граму. Если в мазках при микроскопии с объективом на х90 обнаруживаются грамотрицательные мелкие палочки, располагающиеся по одиночке, без спор, то считают, что в исследуемой пробе воды присутствуют кишечные палочки и делают вывод о том, что исследованная вода не соответствует требованиям СанПиНа и в 100 см³ воды обнаружены общие колиформные бактерии.

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

Контрольные вопросы

1. *Какая служба осуществляет государственный санитарный надзор на предприятиях молочной промышленности?*
2. *Какие формы государственного санитарного надзора Вы знаете?*
3. *какими полномочиями наделены органы и учреждения государственного санитарного надзора?*
4. *Кто осуществляет внутриведомственный санитарный надзор на предприятиях молочной промышленности?*
5. *По каким микробиологическим показателям проводят оценку санитарно-гигиенического состояния воздуха?*
6. *В чем сущность седиментационного метода определения микроорганизмов в воздухе?*
7. *В чем заключается сущность аспирационного метода определения микроорганизмов в воздухе?*
8. *Каким образом можно снизить бактериальную обсемененность воздуха?*
9. *Какие микробиологические показатели определяются согласно ГОСТу в питьевой воде для оценки ее санитарного состояния?*
10. *Каким образом готовятся смывы с оборудования для оценки его санитарного состояния?*
11. *Как проводят контроль чистоты трубопроводов, шлангов, рукавов?*
12. *Какие микробиологические показатели определяют в смывах с оборудования, трубопроводов, посуды?*
13. *Каким образом проводят микробиологический контроль вспомогательных и упаковочных материалов?*
14. *Как определить качество мойки и дезинфекции посуды?*
15. *Как проводят микробиологический контроль чистоты рук работников?*
16. *Как проводят контроль обработки рук работников хлорной известью?*
17. *Как определить содержание микроорганизмов в 1 м³ воздуха?*
18. *Что такое коли-титр, коли-индекс воды?*
19. *Какие способы обеззараживания воды Вам известны?*
20. *Каким образом определяется коли-титр и коли-индекс в питьевой воде?*
21. *Как рассчитывается содержание микроорганизмов в 1 м³ воздуха при использовании седиментационного метода?*

22. Какие микроорганизмы являются санитарно-показательными для воздуха и как они определяются?

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Вербина Н.М., Каптерева Ю.В. Микробиология пищевых производств: Учебник. – М.: Агропромиздат, 1988. – 256 с.
2. ГОСТ 26668-85 «Продукты пищевые и вкусовые. Порядок отбора проб для микробиологических анализов».
3. ГОСТ 9225-84 «Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа».
4. ГОСТ 10444.12-88 «Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневых грибов».
5. ГОСТ 25102-90 «Молоко и молочные продукты. Методы определения содержания спор мезофильных анаэробных бактерий».
6. Королева Н.С. Основы микробиологии и гигиены молока и молочных продуктов. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. – 168 с.
7. Лерина И.В., Педенко А.И. Лабораторные работы по микробиологии: Учеб. Пособие для товаровед. и технол. фак. торг. вузов. – 2 изд., перераб. – М.: Экономика, 1986. – 128 с.
8. Медико-биологические требования и санитарные нормы качества продовольственного сырья и пищевых продуктов. – М.: Изд-во стандартов, 1996.
9. Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов: Методические указания МУК 4.2.577-96. – М.: Информационно-издательский центр Минздрава России, 1998. – 94 с.
10. Методы санитарно-микробиологического анализа питьевой воды: Методические указания МУК 4.2.671-97. – М.: Информационно-издательский центр Минздрава России, 1997. – 36 с.
11. Микробиологические основы молочного производства: Справочник / Л.А. Банникова, Н.С. Королева, В.Ф. Семенихина; Под ред. канд. техн. наук Я.И. Костина. – М.: Агропромиздат, 1987. – 400 с.

- 12.** Микробиология: Практикум / А.Г. Бранцевич, А.Н. Лысенко, В.В. Овод, А.В. Гурбик. – Киев: Вища школа, 1987. – 200 с.
- 13.** Микробиология, санитария и гигиена: Учебник для вузов / К.А. Мудрецова-Висс, А.А.Кудряшова, В.П.Дедюхина. Владивосток: Изд-во ДВГАЭУ, 1997. 312 с.
- 14.** Нецепляев С.В., Панкратов А.Я. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых продуктов животного происхождения. – М.: Агропромиздат, 1990. – 223 с.
- 15.** СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества». Действительно с 1 января 2002 г. - М.; изд-во стандартов, 2002.
- 16.** Слюсаренко Т.П. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых производств. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984 – 208 с.
- 17.** Степаненко П.П. Микробиология молока и молочных продуктов. – М.: Колос, 1996. –271с.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ КРАСИТЕЛЕЙ И ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

1. КРАСИТЕЛИ

Фуксин основной спиртовой раствор – насыщенный

Фуксин основной кристаллический – 10 г

Этиловый спирт, 96% - 100 мл

Фуксин растворяют в 100 мл 96%-ного этанола. Раствор может храниться долгое время в бутылке из темного стекла с притертой пробкой.

Фуксин основной карболовый – фуксин Циля

Фуксин основной кристаллический – 1 г

Карболовая кислота (фенол) - 5 г

Этиловый спирт, 96° - 10 мл

Дистиллированная вода - 100 мл

При приготовлении раствора предварительно взвешивают определенное количество (1 г) фуксина основного кристаллического, вносят в фарфоровую ступку и растирают с определенным количеством (5 г) карболовой кислоты, добавляя спирт небольшими порциями и дистиллированную воду до полного растворения кристаллов, после чего приливают оставшуюся воду. Приготовленный краситель ставят в термостат при 37 °С на двое суток. Затем отфильтровывают через складчатый бумажный фильтр.

Фуксин основной карболовый устойчив и может храниться долго. Хранить следует в бутылке из темного стекла с притертой пробкой.

Фуксин основной карболовый можно приготовить другим способом:

Вначале готовят два раствора.

1-й раствор

Фуксин основной кристаллический – 1 г

Этиловый спирт, 96° - 10 мл

Смесь растирают в фарфоровой ступке до полного растворения кристаллов фуксина.

2-й раствор

Карболовая кислота – 5 г

Дистиллированная вода – 95 мл

Воду подогревают до 50 °С для лучшего растворения карболовой кислоты. Второй раствор вливают в первый, хорошо взбалтывают и фильтруют через складчатый бумажный фильтр.

Фуксин основной, водный (фуксин Пфейффера)

Карболовый фуксин Циля – 10 мл

Дистиллированная вода - 90 мл

Водный фуксин нестойкий, его лучше готовить непосредственно перед употреблением. Раствор водного фуксина может храниться не более 10 дней.

Карболовый генциановый фиолетовый

Генциановый фиолетовый (кристаллы) – 1 г

Этиловый спирт, 96% - 10 мл

Карболовая кислота - 5 г

Дистиллированная вода - 100 мл

Техника приготовления карболового генцианового фиолетового такая же, как карболового фуксина Циля.

При приготовлении карболового генцианового фиолетового можно также готовить предварительно два раствора.

1-й раствор

Генциановый фиолетовый – 1 г

Этиловый спирт, 96% - 10 мл

2-й раствор

Карболовая кислота – 5 г

Дистиллированная вода – 95 мл

Последовательность и способ приготовления первого и второго растворов такие же, как и при приготовлении карболового фуксина Циля.

Приготовление красящих бумажек генцианвиолета (по Синеву)

Для приготовления бумажек фильтровальную бумагу предварительно испытывают на пригодность. Для этого полоску фильтровальной бумаги погружают в спиртовой раствор красителя (карболового генцианового фиолетового), высушивают на воздухе. Хорошая бумага окрашивается равномерно без пятен. Если небольшой кусок такой бумаги положить на стекло с несколькими каплями воды, он сразу же пропитается водой и краситель через несколько секунд перейдет в раствор. Бумагу для пропитывания нарезают полосками (шириной 2,5-3 см, длиной 30 см) и погружают в краситель так, чтобы смачивались обе поверхности. Затем полоски вынимают, высушивают на воздухе при комнатной температуре или в термостате при 37° С.

Пропитывать красящиеся бумажки можно также спиртовым раствором генцианвиолета следующего состава:

Генциановый фиолетовый (кристаллы) – 1 г

Спирт этиловый, 96° - 100 мл

Глицерин - 5 мл

Метиленовый синий (насыщенный спиртовой раствор)

3 г метиленового синего растворяют в 100 мл 96%-ного этанола. Раствор выдерживают 2-3 дня, периодически взбалтывая. Затем фильтруют через бумажный фильтр. Раствор устойчив.

Раствор бриллиантовой зелени (раствор малахитового зеленого)

Водный насыщенный раствор готовится путем растворения 10 г малахитового зеленого в 10 мл дистиллированной воды. *Спиртово-водный раствор*: 10 г малахитового зеленого смешивается с 80 мл дистиллированной воды и 20 мл 96%-ного этанола.

Метиленовый синий 1:40

1 мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего смешивают с 40 мл дистиллированной воды.

Метиленовый синий, щелочной раствор (по Леффлеру)

К 100 мл дистиллированной воды прибавляют 30 мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего и 1 мл 1%-ного водного раствора гидроксида калия.

Метиленовый синий по Финку

Отдельно взвешивают 0,9 г гидрофосфата натрия, 13,6 дигидрофосфата калия и 0,1 г метиленового синего. Каждую навеску растворяют в 500 мл дистиллированной воды. Смешивают 0,25 мл первого раствора с 99,75 мл второго и 100 мл третьего (рН 4,6).

Сафранин (водный)

10 мл 2,5%-ного раствора сафранина в 96%-ном этаноле смешивается со 100 мл дистиллированной воды.

Раствор Люголя (в модификации Грама)

В ступку вместимостью 30-50 мл помещают 1 г кристаллического йода и 2 г йодида калия, растирают смесь пестиком, добавляют 1 мл дистиллированной воды, продолжают растирать кристаллы и добавляют еще 5 мл воды. При этом йод растворяется в йодиде калия. Раствор количественно переносят в склянку и доводят общий объем до 300 мл. Раствор годен не более 30 дней, хранят его в прохладном месте, в темноте, лучше в посуде оранжевого цвета.

Раствор Люголя для выявления гликогена и гранулезы

Кристаллический йод — 1 г

Йодид калия — 3 г

Вода дистиллированная — 300 мл

Раствор готовят так же, как и предыдущий.

Для обнаружения гликогена можно также использовать крепкий раствор йода

Кристаллический йод — 7 г

Йодид калия — 20 г

Вода дистиллированная — 100 мл

Краска Муромцева

Готовят два раствора:

1-й раствор

Фуксин основной – 0,15 г
 Спирт, 96% – 20 мл
 Кристаллическая карболовая кислота – 10 г

2-й раствор

Метиленовый синий – 2,5 г
 Дистиллированная вода – 200 мл
 Оба раствора смешивают и фильтруют через бумажный фильтр.

Раствор туши для выявления капсул

Смешивают 10 мл жидкой натуральной туши с 90 мл дистиллированной воды. Затем раствор центрифугируют 15-20 мин. Верхний слой переносят в пробирку и автоклавируют 30 мин (0,05 МПа, температура 110 °С). После автоклавирования раствор отстаивают две недели, после чего его можно использовать.

2. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ**УНИВЕРСАЛЬНЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ**

Мясопептонный бульон. Приготавливают мясную воду: 1 кг говяжьего мяса, освобожденного от костей, жира, сухожилий, пропускают через мясорубку, заливают 2 л водопроводной воды. Фарш настаивают в воде 12...24 часа на холоде. За это время из мяса экстрагируются водорастворимые белки, аминокислоты, витамины, углеводы, минеральные и другие вещества. Настой фильтруют через двойной слой марли, мясо хорошо отжимают и фильтрат кипятят 30 мин для свертывания белков. Сняв жир, остывшую жидкость пропускают через ватно-марлевый фильтр и доливают водой до первоначального объема. Мясную воду разливают по колбам или бутылкам и стерилизуют в автоклаве при 0,1 МПа в течение 20 мин.

Для приготовления мясопептонного бульона к мясной воде добавляют 1% пептона и 0,5% химически чистого хлорида натрия, кипятят 10 мин, фильтруют через складчатый бумажный фильтр, устанавливают рН 7,2...7,4 10% раствором двууглекислой соды и снова кипятят 10 мин. Мясопептонный бульон должен иметь соломенный цвет и быть совершенно прозрачным. Его разливают в пробирки, колбы, закрывают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют при давлении 0,1 МПа 20-30 мин.

Питательный бульон можно приготовить из заменителей мяса (мясного экстракта, рыбного гидролизата) по способу, указанному на этикетке.

Мясопептонный агар готовится из мясопептонного бульона с добавлением 2...3% измельченного или порошкообразного агар-агара. Раствор нагревают до кипения и кипятят до полного растворения агара. Затем раствор охлаждают до 50 °С и осветляют взбитым куриным белком (1 белок на 1 л среды), смешанным с 30 мл воды, вновь доводят до кипения и кипятят 20 мин. Белок свертывается, оседает и осветляет среду. Горячий агар фильтруют через ватно-марлевый слой, доводят до рН 7,2...7,4, разливают по пробиркам или колбам и стерилизуют 20 мин при давлении 0,1 МПа.

Пептонная вода. Растворяют 30 г пептона в 1 л дистиллированной воды и стерилизуют 20 мин при давлении 0,1 МПа.

Пептонную воду можно также приготовить следующим образом: к 1 л дистиллированной воды добавляют при нагревании 10 г пептона, 5 г хлорида натрия и 0,1 г нитрата калия. Фильтруют через бумажный фильтр и устанавливают pH 7,6...7,8. Разливают по пробиркам и стерилизуют текущим паром дробно по 30 мин в течение 3 сут.

Солодовое сусло. 250...300 г ячменного сухого солода крупного помола заливают 1 л водопроводной воды, нагревают до 48-50 °С и, непрерывно помешивая во избежание образования комочков, поддерживают температуру в течение 30 мин. Затем температуру повышают до 55...58 °С, через 30 мин до 63 °С и на этом уровне выдерживают смесь до полного осахаривания крахмала. Готовую среду отжимают через полотняный фильтр, чтобы удалить дробину, затем фильтруют через складчатый бумажный фильтр. В фильтрате определяют концентрацию сухих веществ (СВ) при 20 °С, которая обычно составляет 18-20%. До нужной концентрации фильтрат разводят водопроводной водой. Для выращивания дрожжей солодовое сусло должно иметь концентрацию 6...8% СВ, для молочнокислых бактерий – 8...12% СВ, для мицелиальных грибов 3...4%, pH среды 5,6...6,0. При более низком значении pH сусло подщелачивают 10% раствором двууглекислой соды или гидроксида натрия. Далее сусло разливают в колбы или пробирки, закрывают их ватно-марлевыми пробками и стерилизуют при давлении 0,05 МПа 30 мин.

Для приготовления данной среды можно также использовать неохмеленное заводское пивное сусло, доведенное до определенного содержания СВ и pH.

Сусло-агар. При приготовлении сусло-агара к солодовому суслу добавляют 2% агара. Для микроорганизмов, образующих кислоты добавляют также немного мела. Среду стерилизуют 30 мин при давлении 0,05 МПа или дробно текущим паром.

Среда используется для выделения, выращивания и хранения дрожжей, мицелиальных грибов, молочнокислых и уксуснокислых бактерий.

Дрожжевой автолизат. *Способ 1:* гомогенную массу из 1 кг прессованных хлебопекарных дрожжей и 1 л водопроводной кипяченой воды ставят в термостат при 50 °С, добавив несколько капель толуола, и выдерживают при периодическом перемешивании 72 ч. По окончании автолиза дрожжей массу нагревают в автоклаве при 0,02 МПа 30 мин. Остывшую массу фильтруют через двойной складчатый бумажный фильтр до полной прозрачности. Прозрачный фильтрат содержит 0,9% азота. Фильтрат нейтрализуют до pH 6,8...7,0, разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при давлении 0,01...0,05 МПа в течение 10...20 мин. *Способ 2:* 1 кг прессованных дрожжей смешивают с 4 л водопроводной воды и выдерживают в термостате при 55 °С в течение 24 час. Затем автолизат фильтруют и стерилизуют при давлении 0,05 МПа 20 мин.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ (ЭЛЕКТИВНЫЕ) ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Среды для выявления стафилококков

Молочно-солевой агар: в 100 см³ питательного агара растворяют при кипячении 6,5 г хлорида натрия, стерилизуют при 0,1 МПа в течение 20 мин. К расплавленному и остуженному до 45°C агару добавляют 10 см³ на 100 см³ обезжиренного стерилизованного молока, тщательно размешивают и разливают тонким слоем в чашки Петри. Учитывают колонии с зоной просветления.

Желточно-солевой агар: к 150 см³ расплавленного и охлажденного до 45°C 6%-ного солевого агара стерильно добавляют 50 см³ желточного раствора (1 желток куриного яйца растворяют в 150-200 см³ физиологического раствора). Быстро перемешивают и разливают в чашки Петри.

Среды для культивирования дрожжей и микроскопических грибов

Среда Сабуро. Основой этой среды является дрожжевая вода. Для приготовления дрожжевой воды 70...100 г свежих прессованных дрожжей (7...10 г сухих дрожжей) кипятят в течение 20...30 мин в 1 л дистиллированной воды и отстаивают в высоком цилиндре на холоде 12 час. Отстоявшуюся жидкость декантируют, добавляют еще 1 л воды, кипятят 30 мин, фильтруют, доводят pH до требуемого значения. Приготовленную среду стерилизуют дробно по 20 мин 2...3 сут. К 100 мл стерильной дрожжевой воды добавляют 1% пептона, 2% агара, после растворения агара вносят 4% глюкозы или мальтозы, фильтруют, разливают в пробирки и стерилизуют при 0,05 МПа в течение 20 мин.

Среду можно готовить и на обычной 1%-ной пептонной воде.

Синтетическая среда Ридер для дрожжей. В состав среды входят (в г/л): сульфат аммония 3, сульфат магния 0,7, нитрат кальция 0,04, хлорид натрия 0,5, дегидрофосфат калия 1,0, гидрофосфат калия. Начальное значение pH среды 6,6. Для изучения размножения дрожжей добавляют 2% сахара, для исследования брожения 5...10%. Полная синтетическая среда содержит также витамины (в мкг/мл): инозит 5, биотин 0,0001, пантотеновую кислоту 0,25, тиамин 1,0, пиридоксин 0,25, никотиновую кислоту 0,5. Стерилизуют среду в автоклаве при давлении 0,1 МПа.

Картофельно-глюкозный агар. Очищенный и нарезанный ломтиками картофель массой 200 г заливают 1 л дистиллированной воды и кипятят в течение 1 часа. Отвар фильтруют, к фильтрату добавляют воду до первоначального объема, 2% глюкозы и 2...3% агар-агара. Среду разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при 0,1 МПа в течение 10 мин. При употреблении устанавливают pH 3,5 при помощи 10%-ного стерильного раствора безводной лимонной кислоты.

Синтетическая среда Чапека для грибов. Состав среды (в г/л): сахароза или глюкоза 30, дигидрофосфат калия 1,0, нитрат натрия 2,0, сульфат магния 0,5, хлорид калия 0,05, сульфат железа 0,1, агар 20. Навеску агара выщелачивают и добавляют к указанным ингредиентам, предварительно растворенным в 1 л дистиллированной воды, прогревают

текучим паром, устанавливают рН 4,0...5,5 10% раствором лимонной кислоты или гидроксида натрия. Фильтруют, разливают в пробирки и стерилизуют дробно текучим паром 3 сут по 30 мин.

Полная среда с лизином для выявления несовершенных дрожжей. В 1 л водопроводной воды вносят (в г/л): глюкозу - 50, сульфат магния - 1, дигидрофосфат калия - 2, лактат калия - 12 мл 50% раствора, L(+) моногидрат лизина - 1, витаминный раствор (на 100 мл стерильной дистиллированной воды добавляют (в г) инозитола 2, пантотената кальция 0,4, никотинамида 0,5, хлоргидраттиамина 0,1), агара - 20. рН среды составляет 5,0...5,2. Среду разливают в пробирки и стерилизуют 15 мин при 0,1 МПа.

Среда с ацетатом для обнаружения несовершенных дрожжей. На 1 л водопроводной воды берут 10 г ацетата натрия, 10 г хлорида аммония, 5 г глюкозы, 3 мл дрожжевого автолизата, разливают в пробирки и стерилизуют при давлении 0,05 МПа в течение 30 мин.

Среды для культивирования молочнокислых бактерий

Цельное молоко разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при 0,1 МПа в течение 10 мин. Среду используют для изучения физиологических свойств молочнокислых бактерий.

Обезжиренное молоко отделяют от сливок путем сепарирования, разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при тех же режимах, что и цельное молоко. Среду используют для изучения физиологических свойств микробов и для группового количественного учета молочнокислых бактерий.

Гидролизованное молоко. В стерильном обезжиренном молоке устанавливают рН 7,6...7,8. Молоко нагревают до 45 °С и к 1 л молока добавляют 0,5 - 1 г панкреатина, предварительно растворенный в теплой воде, и 5 мл хлороформа. Емкость с молоком плотно закрывают корковой пробкой, смесь тщательно перемешивают и ставят в термостат при температуре 40 °С на 18...24 часа. Затем полученную прозрачную жидкость декантируют и фильтруют через бумажный фильтр. Фильтрат разводят водой в 2 раза, устанавливают рН 7,0...7,2 и стерилизуют при 0,1 МПа в течение 15 мин.

Агар с гидролизированным молоком. В гидролизованное молоко вносят 1,5...2,0% агар-агара. Смесь нагревают до кипения и выдерживают до полного растворения агара. Горячую среду фильтруют через ватный фильтр, разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при давлении 0,1 МПа в течение 10...15 мин.

Среда для количественного учета гнилостных бактерий

Молочный агар готовят путем внесения 20% горячего стерильного обезжиренного молока в стерильный расплавленный 2% водный раствор агар-агара. Используется эта среда для количественного учета протеолитических и пептонизирующих бактерий (микрококков, маммококков). Вокруг колоний гнилостных бактерий образуются зоны протеолиза и пептонизации.

Среда с говяжьим жиром. В состав среды входят: пептон – 1 г, дрожжевой автолизат – 0,3, двузамещенный фосфат натрия – 0,1 г, агар – 1,5 г, дистиллированная вода – до 100 мл, pH 7,0...7,4.

Отдельно готовят в пробирках стерильный говяжий жир. Среду стерилизуют при 121 °С (0,1 МПа) в течение 15 мин.

Среды для выявления и идентификации бактерий группы кишечной палочки

Среда Кесслер: к 1 л водопроводной воды добавляют 10 г пептона и 50 мл свежей бычьей желчи. Смесь кипятят на водяной бане 30 мин, помешивая, после чего фильтруют через вату, добавляют 2,5 г глюкозы и доводят объем до 1 л. Устанавливают реакцию среды (pH 7,4-7,6) и добавляют 2 мл 1%-ного водного раствора кристаллического фиолетового. Среду разливают в пробирки или колбы с поплавками в количествах, предусмотренных для контроля отдельных продуктов. Стерилизуют при 0,05 МПа в течение 20 мин. Цвет среды должен быть темно-фиолетовым.

Лактозо-пептонная (глюкозо-пептонная) среда. 10 г пептона, 5 г натрия хлористого, 5 г лактозы (глюкозы) растворяют при нагревании в 1 л дистиллированной воды. После растворения ингредиентов устанавливают pH 7,4...7,6. Среду разливают по пробиркам и стерилизуют при 0,05 МПа 10...15 мин.

Полужидкая среда с лактозой или маннитом (глюкозой). В 1 л дистиллированной воды растворяют 10 г пептона, 5 г натрия хлористого, 4...5 г агар-агара, доводят до кипения, устанавливают pH 7,2...7,4, добавляют 1 мл 1,6% спиртового раствора бромтимолового синего. Стерилизуют при давлении 0,1 МПа 20 мин. В расплавленную среду вносят 5 г лактозы или маннита (глюкозы), нагревают до кипения, разливают в стерильные пробирки на высоту 3...5 см и стерилизуют при 0,05 МПа 10...15 мин. Правильно приготовленная среда – зеленого цвета с синеватым оттенком (цвет бутылочного стекла). Срок хранения такой среды не более 2-х недель.

Среда Эндо (фуксин-сульфитный агар): в 5 мл стерильной воды растворяют 1 г лактозы, подогревают на водяной бане при 100 °С в течение 5 мин, соблюдая стерильность, прибавляют к 100 мл расплавленного 2%-ного мясопептонного агара с pH 7,6-7,8. В отдельную стерильную пробирку вносят 0,5 мл приготовленного накануне и профильтрованного 10%-ного раствора основного фуксина, к которому добавляют свежеприготовленный 10%-ный раствор сульфита натрия до получения бледно-розового окрашивания. Полученную смесь вносят в расплавленный лактозный агар, тщательно перемешивают, избегают вспенивания, и разливают в стерильные чашки Петри. Среда Эндо должна быть свежеприготовленной.

Среды для выявления сульфитредуцирующих клостридий других анаэробов

Железо-сульфитный агар. Основная среда. В 1 л стерильного расплавленного питательного агара добавляют 10 г глюкозы, нагревают до

растворения, разливают мерно во флаконы, автоклавируют при 0,05 МПа 10...15 мин.

20% раствор сульфита натрия и 8%-ный раствор железа сернокислого закисного готовят непосредственно перед употреблением в стерильной посуде на стерильной дистиллированной воде. Раствор сульфита натрия нагревают до полного растворения. Перед выполнением анализа в 100 мл расплавленной основной среды вносят 5 мл 20%-ного раствора сульфита натрия, перемешивают, затем вносят 1 мл 8%-ного раствора сульфита натрия, перемешивают, разливают с соблюдением правил стерильности в стерильные пробирки или флаконы.

Среда Китта-Тароцци. Проваренные и промытые водой кусочки печени или мяса опускают в пробирки и заливают мясопептонным бульоном с 1% глюкозы на $\frac{1}{2}$ объема пробирки. Сверху приливают слой вазелинового масла высотой 1 см. Стерилизуют среду при 0,1 МПа в течение 15 мин.

НОРМИРУЕМЫЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

(выписка из СанПиН 2.3.2. 1078-01)

1. Мясо и мясопродукты; птица, яйца и продукты их переработки

Индекс, группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г, не Более	Масса продукта (г), в которой не допускается					Примечание
		БГКП (коли- формы)	Сульфитреду- цирующие кlostридии	S. aureus	Протей	Патогенные, в т.ч. сальмо- неллы	
1.1. Мясо (все виды убойных животных) охлажденное	1·10 ³	0,1	-	-	-	25	Отбор проб из глубоких слоев, L.monocytogenes в 25 г не допускается
1.2. Полуфабрикаты мясные бескостные крупнокусковые	5·10 ³	0,001	-	-	-	25	L.monocytogenes в 25 г не допускается
1.3. Полуфабрикаты мясные рубленые	5·10 ⁶	0,0001	-	-	-	25	L.monocytogenes в 25 г не допускается
1.4. Колбасы полукопченые и варенокопченые	-	1,0	0,01	1,0	-	25	L.monocytogenes в 25 г не допускается
1.5. Изделия колбасные вареные (колбасы, сосиски, сардельки) - высшего и 1 сорта - второго сорта -	1·10 ³ 2,5 ·10 ³ -	1,0 1,0	0,01 0,01	1,0 1,0	- -	25 25	В сосисках и сардельках L. monocytogenes в 25 г не допускается
1.6. Паштет из печени (или мяса), в т.ч. в оболочках	1·10 ³	1,0	0,1	-*	-	25	*для продуктов, сроки годности которых превышают 2 суток: S.aureus в 1,0 г не допускается

Индекс, группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г, не Более	Масса продукта (г), в которой не допускается					Примечание
		БГКП (коли- формы)	Сульфитреду- цирующие кlostридии	S. aureus	Протей	Патогенные, в т.ч. сальмо- неллы	
1.7. Консервы пастеризован. из говядины или свинины	2·10 ²	1.0	0,1	1,0	-	25	B.cereus в 0,1 г не допускается
1.8. Консервы из говядины, свинины, конины стерилизованные	Должны удовлетворять требованиям промышленной стерильности для консервов группы А						
1.9. Тушки и мясо птицы	1·10 ⁴	-	-	-	-	25	Отбор проб из глубоких слоев мышц L.monocytogenes в 25 г не допускается
- охлажденные	1·10 ⁵	-	-	-	-	25	
- замороженные							
1.10. Готовые быстро замороженные блюда из мяса птицы:							Enterococcus не>1·10 ⁴
- жареные, отварные	1·10 ⁴	0,1	-	1,0	-	25	
- из рубленого мяса с соусами и/или гарнирами	2·10 ⁴	0,1	-	1,0	-	25	
1.11. Яйцо куриное столовое	5·10 ³	0.1	-	-	-	25*	*анализ проводят в желтках
Меланж	5·10 ⁵	0,1	-	1.0	1,0	25	
Яичный порошок	5·10 ⁴	0,1	-	1.0	1,0	25	
1.14. Яйцепродукты сублимационной сушки:							
- желток	5·10 ⁴	0,01	-	1.0	-	25	
- белок, альбумин	1·10 ⁴	0.1	-	1,0	-	25	

2. Молоко и молочные продукты

Индекс, группа Продуктов	КМАФАМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта, в которой не допускается			Дрожжи, плесени, КОЕ/г, не более	Примечание
		БГКП (коли- формы)	<i>S. aureus</i>	Патогенные, в т.ч. сальмонеллы		
2.1. Молоко сырое:						
- высший сорт	$3 \cdot 10^5$	-	-	25	-	Сомат. клетки не $> 5 \cdot 10^5 / \text{см}^3$
- первый сорт	$5 \cdot 10^5$	-	-	25	-	Сомат. клетки не $> 1 \cdot 10^6 / \text{см}^3$
второй сорт	$4 \cdot 10^6$	-	-	25	-	Сомат. Клетки не $> 5 \cdot 10^6 / \text{см}^3$
2.2. Молоко пастеризован.						
- в потребительской таре	$1 \cdot 10^5$	0,01	1,0	25	-	<i>L. monocytogenes</i> в 25 г не допускаются
- во флягах и цистернах	$2 \cdot 10^5$	0,01	0,1	25	-	
2.3. Молоко топленое	$2,5 \cdot 10^3$	1,0	-	25	-	
2.4. Жидкие кисломолочные про- дукты со сроком годности не > 72 ч	-	0,01	1,0	25	-	
2.5. Сметана и продукты на ее основе	-	0,001*	1,0	25	Дрожжи - 50** Плесени - 50**	*для термически обработанных продуктов – 0,01; **для продуктов со сроком годности более 72 ч
2.6. Творог и творожные изделия со сроком годности не > 72 ч	-	0,001	1,0	25	-	
2.7. Творожные изделия, термически обработанные	-	0,01	1,0	25	Дрожжи, плесени < 50	

Индекс, группа Продуктов	КМАФАМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта, в которой не допускается			Дрожжи, плесени, КОЕ/г, не более	Примечание
		БГКП (коли- формы)	<i>S. aureus</i>	Патогенные, в т.ч. сальмонеллы		
2.8. Молоко сгущенное с сахаром в потребительской таре	2·10 ⁴	1,0	-	25	-	
2.9. Какао, кофе натуральный со сгущенным молоком и сахаром, сливки, сгущенные с сахаром	3,5·10 ⁴	1,0	-	25	-	
2.10. Молоко коровье сухое цельное	5·10 ⁴	0,1	1,0	25	-	
2.11. Молоко сухое обезжирен.: - для непосредственного употребления - для промышленной переработки	5·10 ⁴	0,1	1,0	25		
	1·10 ⁵	0,1	1,0	25		
2.12. Сыр Российский	-	0,001	*	25	-	* <i>S. aureus</i> не более 500 КОЕ/г
2.13. Сыры плавленые - без наполнителей - с наполнителями (овощи, грибы и др.)	5·10 ³	0,1	-	25	Плесени < 50 дрожжи < 50	
	1·10 ⁴	0,1	-	25	Плесени < 100 дрожжи < 100	
2.14. Мороженое на молочной основе закаленное	1·10 ⁵	0,01	1,0	25	-	
2.15. Мороженое мягкое из сухих и жидких смесей	1·10 ⁵	0,1	1,0	25	-	
2.16. Масло вологодское	1·10 ⁴	0,1	-	25	-	

Индекс, группа Продуктов	КМАФАМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта, в которой не допускается			Дрожжи, плесени, КОЕ/г, не более	Примечание
		БГКП (коли- формы)	S. aureus	Патогенные, в т.ч. сальмонеллы		
2.17. Масло сладко-сливочное и соленое любительское и крестьянское	1x10 ⁵	0,01	-	25	-	
2.18. Масло кисло-сливочное любительское и крестьянское	-	0,01	-	25	-	
2.19. Масло шоколадное	1x10 ⁵	0,01	-	25	-	
2.20. Масло сливочное бутербродное	5x10 ⁵	0,001	-	25	-	
2.21. Масло коровье топленое	1x10 ³	1,0	-	25	Плесени < 200	

3. Кондитерские изделия

Индекс, группа Продуктов	КМАФАМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта, в которой не допускается			Дрожжи, КОЕ/г, не более	Плесени, КОЕ/г, не более	Примечание
		БГКП (коли- формы)	S. aureus	Патогенные, в т.ч. сальмонеллы			
Торты и пирожные бисквитные, слоеные, песочные, воздушные, заварные, крошковые с отделками, в т.ч. замороженные:							
- сливочной	5·10 ⁴	0,01*	0,01*	25	100	50	* в 0,1 г не допускается со сроком годности 5 и более суток
- белково-сбивной типа суфле	1·10 ⁴	0,01*	0,01*	25	50	100	
- фруктовой, помадной	1·10 ⁴	0,01*	0,1*	25	50	100	

Индекс, группа Продуктов	КМАФАМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта, в которой не допускается			Дрожжи, КОЕ/г, не более	Плесени, КОЕ/г, не более	Примечание
		БГКП (коли- формы)	S.aureus	Патогенные, в т.ч. сальмонеллы			
- из шоколадной глазури	$5 \cdot 10^4$	0,01*	0,1*	25	50	100	** дрожжи –50, плесени- 50 КОЕ/Г, не более со сроком годности 5 и более суток
- жировой	$5 \cdot 10^4$	0,01*	0,1*	25	-**	-**	
- творожно-сливочной	$5 \cdot 10^4$	0,01*	0,01*	25	50	100	
- типа «картошка»	$1 \cdot 10^4$	0,01*	1,0*	25	50	100	
- заварным кремом							

4. Масличное сырье и жировые продукты

Индекс, группа продуктов	КМАФАМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускается		Дрожжи, КОЕ/г, не более	Плесени, КОЕ/г, не более	Примечание
		БГКП (коли- формы)	Патогенные, в т.ч. сальмонеллы			
4.1. Майонез	-		25	$5 \cdot 10^2$	50	
- в потребительской таре	-	0,01	25	$1 \cdot 10^3$	50	
- для промпереработки		0,01				
4.2. Кулинарные и кондитерские жиры	-	0,01	25	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^2$	
4.3. Маргарины столовые, бутербродные	-	0,01	25	$5 \cdot 10^2$	50	
4.4. Кремы на растительных маслах	$1 \cdot 10^4$	0,01	25	50	50	

5. Напитки

Индекс, группа продуктов	КМАФАМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускается			Примечание
		БГКП (коли-формы)	Патогенные, в т.ч. сальмонеллы	Дрожжи, плесени, КОЕ/г, не более	
5.1. Пиво разливное	-	1,0	25	-	
5.2. Пиво непастеризованное					
- в кегах	-	3,0	25	-	
- в бутылках	-	10,0	25	-	
5.3. Пиво пастеризованное и обеспложенное	500	10,0	25	40	

6. Продукты питания для детей раннего возраста (продукты на молочной основе)

Индекс, группа продуктов	КМАФАнМ КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускается				B.cereus, КОЕ/г, не более	Плесени, КОЕ/г, не более	Дрожжи, КОЕ/г, не более	Примечания
		БГКП (коли-формы)	E.coli	S.aureus	Патогенные в т.ч. сальмонеллы и L.monocytogenes				
6.1. Частично адаптированные молочные смеси:									*восстанавливаемы при 37-50 °C

Индекс, группа продуктов	КМАФАнМ КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускается				B.cereus, КОЕ/г, не более	Плесени, КОЕ/г, не более	Дрожжи, КОЕ/г, не более	Примечания
		БГКП (коли- формы)	E.coli	S.aureus	Патогенные в т.ч. сальмонеллы и L.monocytogenes				
- инстантного приготовления - требующие термической обработки	2·10 ^{3*}	1,0	10	10	100	100	50	10	**восстанавливаемых при 75-85 °С
	3·10 ^{3**} 2,5·10 ⁴	1,0	-	1.0	50	200	100	50	
6.2. Молоко сухое для детского питания - инстантного приготовления - требующего кипячения после восстановления	2·10 ^{3*}	1,0	10	10	100	100	50	10	
	3·10 ^{3**} 2,5·10 ⁴	1,0	-	1.0	25	-	100	50	
6.3. Каши сухие безмолочные быстрорастворимые	1·10 ⁴	1,0	-	-	50	200	100	50	
6.4. Каши сухие молочные, требующие варки	5·10 ⁴	0,1	-	-	50	-	2·10 ²	100	

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	Стр. 3
Устройство микробиологической лаборатории.....	4
 <u>ОБЩАЯ ЧАСТЬ</u>	
 ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1	
Приготовление и стерилизация питательных сред, посуды для проведения микробиологического анализа....	6
 ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2	
Устройство микроскопа и правила работы с ним. Виды микроскопии. Приготовление фиксированных препаратов бактерий и окраска их простыми методами.....	15
 ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3	
Изучение морфологии бактерий. Сложные и дифференциальные методы окраски бактерий.....	25
 ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №4	
Изучение морфологических и культуральных признаков микроскопических грибов и дрожжей. Приготовление препаратов «раздавленная капля».....	31
 ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5	
Культивирование. Получение чистых и накопительных культур микроорганизмов. Изучение культуральных свойств и морфологии выделенных культур (выполняется на 2-х занятиях).....	37
 <u>СПЕЦИАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</u>	
 ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6	
Принципы микробиологического контроля на предприятиях пищевой промышленности. Микробиологическое исследование пищевых продуктов (выполняется на 2-х занятиях).....	48

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №7

Микробиологическое исследование заквасок и кисломолочных продуктов	64
--	----

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №8

Микробиологический контроль качества производственных дрожжей.....	70
--	----

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №9

Санитарно-гигиенический контроль условий производства (выполняется на двух занятиях).....	82
---	----

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	92
--------------------------------------	-----------

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Приготовление некоторых красителей и питательных сред	94
---	----

Приложение 2. Нормируемые микробиологические показатели пищевых продуктов (выписка из СанПиН 2.3.2.1078-01).....	102
--	-----

УЧЕБНОЕ ИЗДАНИЕ

Еремина Ирина Александровна
Кригер Ольга Владимировна

Лабораторный практикум по микробиологии

Учебное пособие

Для студентов вузов

Зав. редакцией *И.Н. Журина*
Редактор *Е.В. Макаренко*
Технический редактор *Т.В. Васильева*
Художественный редактор *Л.П. Токарева*

ЛР №020524 от 02.06.97.
Подписано в печать _____. Формат 60x84^{1/16}
Бумага типографская. Гарнитура Times.
Уч.-изд.л. 7,0. Тираж ____ экз.
Заказ №_____

Оригинал-макет изготовлен в редакционно-издательском отделе
Кемеровского технологического института пищевой промышленности
650056, г. Кемерово, б-р Строителей, 47

ПЛД №44-09 от 10.10.99
Отпечатано в лаборатории множительной техники
Кемеровского технологического института пищевой промышленности
650010, г. Кемерово, ул. Красноармейская, 52