Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение
высшего образования
«Саратовский государственный аграрный университет
имени Н.И. Вавилова»

Микробиология
Методические указания выполнению лабораторных работ

Направление подготовки
35.03.07 Технология производства и переработки
сельскохозяйственной продукции

Профиль подготовки
«Технологии пищевых производств в АПК»

Саратов 2018

Микробиология: метод. указания по выполнению лабораторных работ для направления подготовки 35.03.07 Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции / Сост.: Горельникова Е.А. // ФГБОУ ВО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2018. – 66 с.

Методические указания по выполнению лабораторных работ составлены в соответствии с программой дисциплины и предназначены для студентов направления подготовки 35.03.07 Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции; содержит краткое описание лабораторных методов по микробиологии. Направлены на формирование у студентов навыков проведения методов изучения живых объектов и микроорганизмов. Материал ориентирован на вопросы профессиональной компетенции будущих специалистов сельского хозяйства.

ВВЕДЕНИЕ

Задачей лабораторной практики является закрепление основных разделов теоретического курса, ознакомление студентов с основными закономерностями строения и организации микробной клетки, знакомит с процессами, протекающими в ней. Курс нацелен на формирование у студентов профессиональной компетенции: «Способен использовать в практической деятельности специализированные знания фундаментальных разделов физики, химии, биохимии, математики для освоения физических, химических, биохимических, биотехнологических, микробиологических, теплофизических процессов».

По каждой теме предусмотрены: минимум теоретического материала, ход выполнения работы, перечень необходимого оборудования, список литературы.

ТЕМА 1 ПРАВИЛА РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАЮОРАТОРИИ. МИКРОСКОПИЯ. МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ.

Цель. Ознакомить студентов с техникой безопасности при работе в микробиологическом практикуме. Приобрести навыки по изучению фиксированных бактериальных препаратов. Изучить основные морфологические формы бактерий.

Техника безопасности в лаборатории микробиологии

1. На занятиях необходимо находиться в халате и чепчике (косынке). Рукава халата должны быть застегнуты, волосы заправлены под косынку.
2. В помещении практикума запрещается принимать пищу и пить воду.
3. Нельзя класть на рабочий стол одежду и сумки.
4. До начала занятия следует записать в тетрадь задание и подготовиться к его выполнению. В процессе работы производятся записи и зарисовки.
5. После работы с культурами микроорганизмов необходимо мыть руки.
6. Запрещается отвлекать товарища, если в его руках находится пробирка с культурой микроорганизмов.
7. Пламя над газовой горелкой не должно превышать 15 см, кончик языка пламени должен быть слегка окрашен в желтый цвет. Нельзя зажигать горелку от горелки.
8. Работа с анилиновыми красителями разрешается только на специальном столе.
9. Все предметы, которые были использованы при работе с живыми микробами (петли, пипетки, предметные стекла и др.), должны быть сразу обеззаражены либо прожиганием на пламени (петли, предметные стекла), либо погружением в дезинфицирующий раствор.
10. Если культура микроорганизмов попала на руку работающего, то необходимо уведомить об этом преподавателя, обработать руки дезинфицирующим раствором (2% раствор хлорамина) и через 2 минуты вымыть их.
11. Если культура микроорганизмов из пробирки пролилась на стол или была разбита пробирка с микроорганизмами, то студент должен под контролем преподавателя смочить инфицированное место дезинфицирующим раствором и поставить рядом записку с указанием времени обработки (экспозиция дезинфицирующего раствора должна составлять 2 часа).
12. На каждое занятие назначаются 2 дежурных, в обязанности которых входит: 1) проследить, чтобы студенты протерли объективы микроскопов и поставили микроскопы в шкаф, собрать рабочий материал и поставить на стол преподавателя; 2) убрать с рабочих столов петли, пинцеты, посуду, реактивы; 3) вытереть доску.
13. В конце занятия студент должен: 1) привести в порядок свое рабочее место; 2) сдать дежурному весь материал и микроскоп; 3) вымыть руки; 4) представить тетрадь с зарисовками и протоколами для подписи преподавателя.

Микроскоп (от греч. micros – малый, scopeo – смотрю) - оптический прибор для изучения малых объектов, недоступных невооруженному глазу.

Микроскоп имеет механическую и оптическую части. Механическая часть микроскопа состоит из штатива (рис. 1), в котором различают нижнюю часть или ножку (7) микроскопа, и верхнюю часть или колонку (9), соединенную с нижней при помощи шарнира (8). К колонке прикреплен предметный столик (4). К верхней части колонки присоединена трубка микроскопа - тубус (1). В тубус микроскопа сверху вставлен окуляр (12), а в нижней части он снабжен вращающимся по кругу «револьвером» (2), в отверстия которого ввинчиваются объективы (3). Тубус передвигается вверх и вниз с помощью двух систем: для грубого передвижения служит макрометрический винт (11) или микровинт. Им пользуются при слабых увеличениях, а также при сильных объективах для

первоначальной грубой установки. Для более точной установки служит микрометрический винт (10) или микровинт.

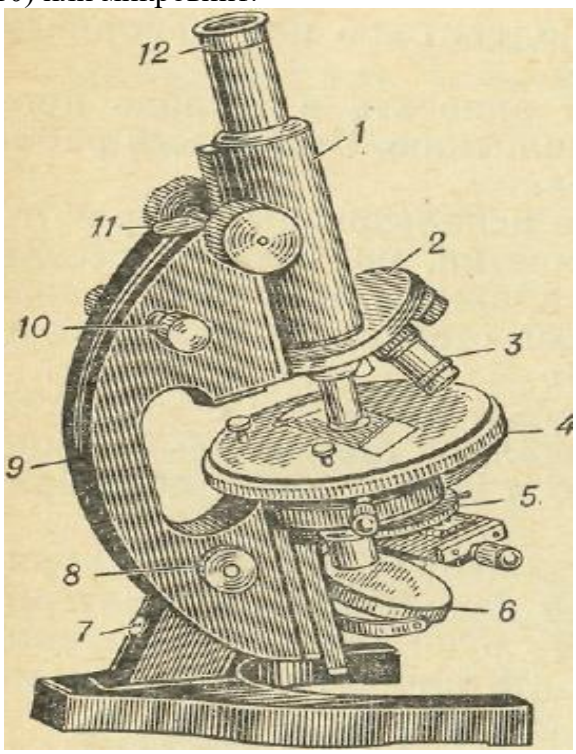

Рисунок 1. Строение светового микроскопа

Оптическая часть микроскопа состоит из осветительного аппарата, объективов и окуляров. Осветительный аппарат состоит из зеркала и конденсатора с диафрагмой. Зеркало (6) служит для отражения световых лучей по направлению к объективу и через него внутрь микроскопа. Одна сторона зеркала плоская, другая – вогнутая. При работе конденсором пользуются плоским зеркалом. Конденсор (5) состоит из системы сильных линз, предназначенных для собирания лучей, идущих от зеркала, в одной точке – фокусе, который должен находиться в плоскости рассматриваемого препарата. При микроскопировании с дневным светом конденсор должен быть поднят до уровня предметного столика. При искусственном освещении конденсор опускают до тех пор, пока при малом увеличении изображение источника света не появится в плоскости препарата. При изучении неокрашенных объектов следует опускать конденсор. Объем лучей сообразно с потребностями исследования регулируется диафрагмой, находящейся под конденсором, которая при помощи рычага может суживаться и расширяться. Окрашенные препараты рассматривают при совершенно открытой диафрагме. При рассматривании неокрашенных объектов следует сузить отверстие диафрагмы, причем приходится тем сильнее закрывать его, чем тоньше структура изучаемого объекта. Объективы представляют собой систему линз, заключенных в металлическую оправу. На оправе объективов обозначается даваемое ими увеличение, например: Х8, Х40, Х90. Все объективы разделяются на сухие и иммерсионные или погружные. Сухим называют такой объектив, между фронтальной линзой которого и рассматриваемым препаратом находится воздух. При этом, ввиду разницы показателей преломления стекла (на котором находится изучаемый препарат) и воздуха, часть световых лучей отклоняется и не попадает в глаз наблюдателя. При исследовании микробов применяется иммерсионный или погружной в масло объектив. Его преимущество перед сухими объективами состоит в том, что между стеклом и линзой устанавливается однородная (гомогенная) среда (стекло препарата – масло – стекло объектива) с одинаковым показателем преломления. Благодаря этому все лучи, не преломляясь и не изменяя направления, попадают в объектив, чем и достигается наилучшее освещение мельчайших объектов. Для этого обычно пользуются кедровым маслом или иммерсионным маслом, показатель преломления которого (1,52) почти равен

показателю преломления стекла. Окуляры также обозначают по тому увеличению, которые они дают, например: Х6, Х7, Х10, Х 12, Х15.

Общее увеличение микроскопа равняется произведению увеличения объектива на увеличение окуляра. Таким образом, например, комбинация иммерсионного объектива с показателем увеличения Х90 и окуляром Х10 дает увеличение объекта в 900 раз и т. д. Микроскопы, употребляемые в повседневной работе, дают увеличение порядка 700 – 900.

Бинокулярный микроскоп имеет обычный для микроскопа оптический предел, но обладает преимуществом в самом процессе микроскопирования. В нем колонка имеет насадку с двумя тубусами, следовательно, и с двумя окулярами. При наблюдении объекта обоими глазами одновременно достигается большая резкость глубины, меньше утомляется зрение.

Исследование в темном поле. Микроскоп с темным полем зрения отличается от обычного микроскопа способом освещения препарата: применяется яркое боковое освещение, вследствие чего получается изображение светящегося объекта на темном фоне. При этом косые лучи не попадают в объектив и, следовательно, в глаз наблюдателя, в силу чего поле зрения оказывается совершенно неосвещенным (темное поле зрения). В глаз наблюдателя попадают только лучи, натолкнувшиеся на своем пути на исследуемый объект и отраженные от него.

Люминесцентная микроскопия основана на способности некоторых объектов и красителей светиться при освещении их ультрафиолетовыми лучами, синими или другими коротковолновыми лучами света. Различают собственную (первичную) люминесценцию и наведенную (вторичную). При первичной люминесценции исследуемый объект содержит вещества, способные флюоресцировать при освещении их ультрафиолетовыми лучами. Большая часть объектов не обладает собственной люминесценцией, поэтому при люминесцентной микроскопии пользуются обработкой объекта красителями, способными флюоресцировать. Такие красители получили название флюорохромов. Люминесцентные микроскопы – микроскопы, которые снабжены источником ультрафиолетового света и набором светофильтров.

Фазовоконтрастный микроскоп применяется для изучения неокрашенных препаратов, живых объектов, размножения микроорганизмов и т. д. С помощью фазовоконтрастного устройства и происходит превращение фазовых невидимых изменений в амплитудные контрастные видимые. Фазово-контрастное приспособление состоит из специального фазового конденсора, содержащего кольцевую диафрагму, и набора объективов, в которые вставлены фазовые пластинки в форме кольца. Пучок света, проходя через кольцевую щель диафрагмы и объект, попадает в кольцо фазовой пластинки объектива и глаз наблюдателя. Метод фазовых контрастов может быть положительным (на светлом фоне темное изображение объекта) или отрицательным (на темном фоне светлое изображение).

В электронном микроскопе вместо световых лучей используется поток электронов. Источником электронов в этом приборе является электронная пушка (электроннолучевая трубка). Электронный микроскоп дает увеличение в 20000 – 40000 раз. При последующем оптическом увеличении в 4 – 5 раз можно получить полезное увеличение в 100 000 – 200000 раз.

Правила работы с микроскопом

1. Установить микроскоп штативом к себе, предметным столиком от себя.

2. Поставить в рабочее положение объектив малого увеличения.

3. Глядя в окуляр левым глазом, вращайте зеркало в разных направлениях, пока поле зрения не будет освещено ярко и равномерно.

4. Положите на предметный столик приготовленный препарат (покровным стеклом вверх), чтобы он находился в центре отверстия предметного столика.

5. Под визуальным контролем (смотреть не в окуляр, а сбоку) медленно опустить тубус с помощью макровинта, чтобы объектив находился на расстоянии 2 мм от препарата.

6. Глядя в окуляр, медленно поднимать тубус, пока не появится изображение объекта.

7. Для того чтобы перейти к рассмотрению объекта при большом увеличении микроскопа, надо отцентрировать препарат, т.е. поместить объект в центр поля зрения.

8. Вращая револьвер, перевести в рабочее положение объектив большого увеличения.

9. Опустить тубус под визуальным контролем почти до соприкосновения с препаратом.

10. Глядя в окуляр, медленно поднимать тубус, пока не появится изображение.

11. Для тонкой фокусировки использовать микроскопический винт.

12. При зарисовке препарата смотреть в окуляр левым глазом.

Морфология основных форм бактерий

Известны три основные формы бактерий: шарообразная, палочковидная (цилиндрическая) и извитая. В соответствии с этим все бактерии по форме подразделяются на следующие группы: 1) кокки (шарообразные); 2) бактерии (палочковидные); 3) спириллы (извитые в виде спирали).

1. Кокки - микробы круглой формы. Они различаются между собой по взаимному расположению отдельных клеток, которое зависит от способа их деления. Если по окончании деления кокки разъединяются на отдельные шарики, получаются одиночные клетки кокков. Группа из двух кокков носит название диплококки - *Diplococcus* (от греч. diplo – двойной) (рис. 2 (2, 3)). Если деление кокков происходит лишь в одном направлении и образующиеся кокки не разъединяются, то получается нить из шариков в виде цепи, более или менее длинной в зависимости от числа кокков. Эта форма носит название стрептококков – *Streptococcus* (греч. streptos – плетеный) (рис. 2 (4)). При делении в двух взаимно перпендикулярных направлениях возникают сочетания по четыре кокка: тетракокки – *Tetracoccus* (рис. 2 (5)). Если деление происходит в трех взаимно перпендикулярных направлениях, кокки соединяются в виде пакетов (кубиков) и получают название сарцин – *Sarcina* (от греч. sarcio – соединяю) (рис. 2 (6)). Делясь в разных направлениях без особой правильности, кокки образуют беспорядочные скопления клеток, напоминающие виноградные грозди, почему они и получили название стафилококков – Staphylococcus (от греч. staphylo – виноградная гроздь) (рис. 2 (1)).

2. Палочковидная форма представлена самой многочисленной и разнообразной группой бактерий. В классификации палочковидных форм принято именовать бациллами те палочки, которые способны образовывать споры (рис. 2 (9)); палочки, неспособные к спорообразованию, называются бактериями (рис. 2 /9, 8/). Располагаются поодиночке, парами (диплобациллы), цепочками (стрептобациллы), беспорядочно и под углом в виде буквы Х или У.

3. Извитые формы — спириллы; если у бактерии только один завиток спирали, то она имеет вид изогнутой палочки или запятой и носит название вибриона (*vibrio*), например холерный вибрион (рис. 2 (10)). Если завитков больше, бактерия называется спириллой (рис. 2 (12)), если завитков совсем много, то спирохета (рис. 2 (11)).

Рисунок 2. Основные морфологические формы бактерий
1 – стафилококки; 2, 3 – диплококки; 4- стрептококки; 5 – тетракокки; 6 - сарцины;
7, 8 – палочки, не образующие спор (бактерии); 9 – палочки, оборазующие споры (бациллы); 10 – вибрионы; 11 - спирохеты; 12 - спириллы.

Задание

1. Рассмотреть, зарисовать и подписать полным и сокращенным видовым названием и сокращенно препараты кишечной палочки (*Escherihia coli)* и золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus).*
2. Указать, к какой морфологической группе они относятся.

Оборудование: световые микроскопы с масляными иммерсионными системами; настольные лампы; иммерсионное масло; фиксированные на предметных стёклах окрашенные бактериальные препараты кишечной палочки, стафилококка, бацилл; толуол.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Карпунина*, Л.В. Учебно-методическое пособие для выполнения лабораторных работ по дисциплине «Микробиология и иммунология» для студентов направления 111100.62 - "Зоотехния", профиль подготовки «Непродуктивное животноводство» / Л.В. Карпунина, Е.А. Горельникова. – Саратов: Изд-во ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2012.

ТЕМА 2 ТЕХНИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО МАЗКА. ПРОСТОЕ ОКРАШИВАНИЕ.

Цель: ознакомить студентов с красками, применяемыми для окрашивания микроорганизмов, техникой приготовления бактериального мазка и с методами окрашивания микроорганизмов.

Наиболее пригодными для окраски микробов являются анилиновые краски: основные, кислые и нейтральные. Кислые краски менее пригодны. Бактерии лучше всего окрашиваются основными красками, так как их ядерный материал – нуклеиновые кислоты – распределен по цитоплазме. Анилиновые краски поступают в продажу в виде сухих порошков и кристаллов, из которых в лабораториях приготовляют растворы. Сначала готовят хорошо сохраняющиеся насыщенные спиртовые растворы. Для окраски бактерий они непригодны, так как слишком сконцентрированы и могут повредить клетку. Из них приготовляют спиртоводные растворы, которые и применяют в повседневной практике. По цвету краски делят на 4 основные группы:

1) красные (фуксин, сафранин);

2) синие (метиленовая синяя);

3) зеленые (малахитовая зелень);

4) фиолетовые (генцианвиолет).

Если мазок тонкий и трудно определить, на какой стороне стекла он находится, достаточно подышать на стекло, чтобы мазок явственно выступил, тогда как вся поверхность стекла, где мазка нет, равномерно запотевает. Можно также слегка поцарапать мазок петлей, от нее останется след.

Количество краски должно быть таким, чтобы покрыть всю поверхность мазка: достаточно нескольких капель краски, наливаемых при помощи пипетки. По истечении срока окрашивания краску сливают с препарата и промывают его легкой струей воды. При этом со стекла смывается только лишняя краска; краска же, адсорбированная микробами, остается. Оставшуюся на стекле воду осторожно удаляют - или отсасывая ее краем фильтровальной бумаги, или слегка прижимая кусочек бумаги к мазку. Окрашенный мазок должен быть совершенно сухим, так как остаток воды образует с кедровым маслом, нанесенным на мазок, эмульсию, мешающую микроскопированию.

Приготовление окрашенного препарата включает:

1 – приготовление мазка,

2 – высушивание мазка,

3 – фиксацию,

4 – окраску.

1. Приготовление мазка. Препараты готовят на совершенно чистых предметных стеклах. Стекло может быть признано чистым, если помещенная на него капля воды легко расплывается по поверхности, а не принимает шаровидную форму или распадается на отдельные капельки. Для приготовления мазка на середину чистого предметного стекла наносят небольшую каплю воды и помещают в нее исследуемый материал. Если препарат готовят из культуры на плотной среде, то, соблюдая правила асептики, из пробирки берут прокаленной предварительно петлей немного материала, и часть его погружают в каплю воды, слегка растирая в ней, а остаток культуры в петле сжигают на пламени горелки, прокаливая петлю до оранжевого цвета. Остудив петлю, приступают к изготовлению мазка: сначала краем петли культуру равномерно размешивают в капле, а затем, положив петлю всей плоскостью, равномерными круговыми движениями распределяют каплю на площади, составляющей примерно 1/3 предметного стекла. Если препарат изготовляют из жидкой питательной среды, то берут каплю культуры петлей (полное ушко петли) или пастеровской пипеткой и, поместив каплю на середину сухого

чистого стекла, равномерно распределяют ее в форме мазка. После приготовления мазка петлю тотчас же, не выпуская из рук, прожигают на пламени горелки для стерилизации, а пипетку опускают в сосуд с дезинфицирующим раствором.

2. Высушивание мазка. Мокрый мазок высушивают, держа стекло мазком вверх, в струе теплого воздуха высоко над пламенем горелки. Это нужно производить крайне осторожно, не допуская перегревания мазка, так как при этом может произойти слишком быстрое и грубое свертывание белков в протоплазме микробов, что нарушит их структуру. Если препарат высушен не полностью, то при фиксации он окажется также испорченным.

3. Фиксация. Фиксацию препарата проводят с целью: 1) убить микробов и сделать безопасным дальнейшее обращение с ними; 2) прикрепить мазок к стеклу, чтобы он не смывался при дальнейших манипуляциях; 3) сделать микробов более восприимчивыми к окраске, так как убитые микробные клетки окрашиваются лучше, чем живые.

Способов фиксации существует много. Наиболее распространенным является физический способ - фиксация нагреванием на пламени горелки. Большим и указательным пальцами препарат берут за край стекла мазком вверх и несколько раз проводят через наиболее горячую часть пламени горелки (на границе светлой и темной его части). Вся манипуляция занимает 5-6 секунд, причем препарат подвергается действию пламени не более 2 секунд. Если препарат хорошо зафиксирован, то стекло при легком прикосновении уголком к тыльной поверхности левой руки тотчас по окончании фиксации слегка обжигает кожу. В ряде случаев (например, при исследовании мазка крови, изучении тонких структур клетки простейших и спирохет) фиксация жаром оказывается слишком грубой. Тогда прибегают к фиксации препарата жидкостями (химический способ). При этом фиксатор наливают на мазок или препарат погружают в сосуд с фиксирующей жидкостью на определенное время, а затем высушивают. Для этого можно пользоваться одним из следующих способов фиксации:

а) этиловым спиртом в течение 10-15 минут;
б) метиловым спиртом в течение 2-5 минут;
в) ацетоном в течение 5 минут;
г) смесью равных объемов этилового спирта и эфира (по Никифорову) в течение 10-15 минут;
д) смесью Карнуа (60 мл этилового спирта 96%, 30 мл хлороформа, 10 мл ледяной уксусной кислоты).

4. Окрашивание мазков проводят после фиксации. Способы окрашивания микробов делятся на простые и сложные, или дифференциальные. Изучение морфологии микробов в микробиологии обычно проводят в убитом и окрашенном состоянии. Это позволяет значительно легче производить исследование, пользуясь убитыми микробами (особенно при изучении патогенных микроорганизмов).

При простом методе окраски применяется только один краситель. Наиболее часто применяемые красящие растворы: сине-фиолетовый - карболовый генцианвиолет; красные - карболовый фуксин (фуксин Циля), фуксин Пфейффера (фуксин Циля, разведенный дистиллированной водой в 10 раз); синяя - щелочная метиленовая синяя (синька Леффлера). Генцианвиолет и фуксины красят быстрее (1-2 минуты), интенсивнее и окрашивают одинаково все виды бактерий. Метиленовая синяя красит медленнее (3-5 минут), менее ярко, но препараты получаются более ясными. Кроме того, она дает окраску различной интенсивности у разных видов бактерий. Простая окраска позволяет быстро и хорошо ознакомиться с общей морфологией микробов, ввиду чего этот способ применяется в лабораториях наиболее часто.

Окрашенные препараты имеют следующие преимущества:

- они менее опасны, так как все манипуляции проводятся с фиксированным материалом;

- в них легко различимы отдельные детали структуры микробной клетки, не выявляющиеся в неокрашенном препарате;
- могут храниться длительное время и, следовательно, использоваться для учебных целей как демонстрационный материал.

К недостаткам окрашенных препаратов следует отнести:

- невозможность изучения физиологии микробов (подвижность, характер деления, прорастание спор и т. д.);
- деформацию микробных клеток после фиксации и воздействия красящих растворов.

Оборудование: культуры бактерий, краски, предметные стекла, микробиологические петли, газовая горелка, микроскоп.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Карпунина*, Л.В. Учебно-методическое пособие для выполнения лабораторных работ по дисциплине «Микробиология и иммунология» для студентов направления 111100.62 - "Зоотехния", профиль подготовки «Непродуктивное животноводство» / Л.В. Карпунина, Е.А. Горельникова. – Саратов: Изд-во ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2012.

ТЕМА 3. СЛОЖНОЕ ОКРАШИВАНИЕ. ОКРАСКА ПО МЕТОДУ ГРАМА.

Цель: ознакомить студентов методом окрашивания микроорганизмов Грама, Произвести окрашивание микроорганизмов по методу Грама. .

Сложный или дифференциальный метод окраски бактерий основан на особенностях физико-химического строения микробной клетки. Сложный метод окраски последовательное применение нескольких красителей. Они применяются для детального изучения структуры клетки, а также для характеристики и дифференциации данного микроба от других. Таким образом, сложные способы окраски микробов являются необходимым диагностическим методом в микробиологической практике. Наибольшее практическое значение имеет окраска по методу Грама и по методу Циль-Нильсена.

Окраска по Граму

Метод окраски, предложенный в 1884 году Грамом, является самым распространенным из сложных способов окраски. Все бактерии по своему отношению к этому методу разделяются на две группы: окрашивающиеся по Граму - грамположительные, или грампозитивные и неокрашивающиеся - грамотрицательные, или грамнегативные. Этот метод показывает не только форму бактерий, но и характеризует строение их клеточной стенки. Различное отношение к окраске по Граму зависит от разницы в физико-химическом составе микробных клеток, а также от структуры их клеточной стенки. Клеточные стенки грамположительных бактерий довольно толстые, их каркас состоит из 40 слоев молекул пептидогликана (муреина), который составляет до 70% от массы всей клеточной стенки, скрепленных "прошивками" из тейхоевых кислот. У грамотрицательных бактерий клеточная стенка тонкая, муреина содержит менее 10%, и тейхоевые кислоты в ее составе отсутствуют. Сущность этого метода состоит в том, что генцианвиолет и йод образуют в протоплазме бактериальной клетки комплексное соединение фиолетового цвета, которое либо удерживается (у грамположительных бактерий), поскольку поры в клеточной стенке после обработки спиртом суживаются, либо вымывается спиртом (у грамотрицательных бактерий), поскольку клеточная стенка из-за большого содержания липидов менее проницаема и поры в ней после обработки спиртом остаются достаточно широкими. Таким образом, грамположительные микробы остаются окрашенными в сине-фиолетовый цвет, а грамотрицательные не обладают свойством удерживать краску и при обработке спиртом обесцвечиваются.

Методика окраски по Граму

1. На фиксированный мазок кладется фильтровальная бумага, на которую наносится карболовый генцианвиолет (на 2 минуты).
2. Бумага с красителем удаляется, и на мазок наносится раствор Люголя (на 2 минуты).
3. Раствор Люголя сливается, и наносится либо 96% этанол (на 20 секунд), либо йодированный спирт (на 2 минуты).
4. Мазок промывается водой.
5. Наносится раствор фуксина (фуксин Пфейффера) на 3 минуты.
6. Мазок промывается водой, высушивается.
7. На высушенный мазок наносят каплю иммерсионного масла и микроскопируют с иммерсионной системой.

Удобной модификацией является способ Синева, при котором пользуются заранее приготовленными полосками фильтровальной бумаги, пропитанной генцианвиолетом и затем высушенной. Эти полоски кладут на фиксированный мазок, на который предварительно наносят 2-3 капли воды. В остальном техника окраски аналогична оригинальному способу Грама.

Грамположительные микробы при окраске генцианвиолетом приобретают темно-фиолетовый цвет, грамотрицательные окрашиваются в дополнительный красный цвет фуксином. Чтобы получить правильную окраску, рекомендуется употреблять для окраски

по Граму свежие (суточные) культуры микробов. Окраска старых культур дает непостоянные результаты. Для того чтобы легче запомнить отношение различных видов бактерий к окраске по Граму, следует иметь в виду, что все патогенные кокки, за исключением гонококка и менингококка, являются грамположительными, а извитые формы микробов (вибрионы, спирохеты) — грамотрицательными. Среди палочковидных бактерий встречаются как грамположительные, так и грамотрицательные. Большинство спорогенных бацилл окрашивается по Граму положительно.

Задание

1. Приготовить мазки из взвесей бактерий нескольких видов. Окрасить их простым методом (фуксином, метиленовой синькой), промикроскопировать, зарисовать и подписать названия видов бактерий, названия их форм.

2. Приготовить мазки из взвесей грамположительных бактерий (например, кокков *Staphylococcus aureus*) и грамотрицательных бактерий (например, бактерий *Escherichia coli*). Окрасить их по методу Грама, промикроскопировать, зарисовать, подписать названия видов микроскопируемых бактерий, цвет и способность или неспособность окрашиваться по методу Грама.

Оборудование: культуры бактерий, краски, предметные стекла, микробиологические петли, газовая горелка, микроскоп.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Карпунина,* Л.В. Учебно-методическое пособие для выполнения лабораторных работ по дисциплине «Микробиология и иммунология» для студентов направления 111100.62 - "Зоотехния", профиль подготовки «Непродуктивное животноводство» / Л.В. Карпунина, Е.А. Горельникова. – Саратов: Изд-во ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2012.

ТЕМА 4. СЛОЖНОЕ ОКРАШИВАНИЕ. ОКРАСКА СПОР ПО ЦИЛЬ-НИЛЬСЕНУ.

Цель: ознакомить студентов окрашиванием спор по методу Циль-Нильсена. Произвести окрашивание микроорганизмов по методу Циль-Нильсена.

Споры бактерий по сравнению с вегетативными клетками обладают более высокой устойчивостью к неблагоприятным условиям внешней среды Споры кислотоустойчивы, поэтому с трудом окрашиваются красителями. Объясняется это большой плотностью оболочки, низкой концентрацией свободной воды в ней и высоким содержанием липидов в спорах. В препаратах окрашенных простыми способами или по Грамму, споры остаются бесцветными. Споры по сравнению с цитоплазмой характеризуются более высоким показателем преломления света, поэтому при микроскопировании в светлом поле они видны как более темные включения на фоне споры.

В связи с особенностями физико-химического состава и плотной малопроницаемой оболочки для окраски спор применяют сначала химические вещества, меняющие структуру оболочки. Однако при последующем прокрашивании споры одновременно прокрашивается и цитоплазма клетки, поэтому под микроскопом последняя выглядит однородно окрашенной. Чтобы добиться прокраски только споры, следует такой «перекрашенный» препарат частично обесцветить, отнимая краситель у цитоплазмы и оставляя его в споре. Это легко достигается, так как краситель, адсорбированный спорой, удерживается прочнее, чем адсорбированный цитоплазмой клетки. Поэтому все способы окраски спор основаны на едином принципе. Сначала споры протравливают разными веществами (хромовой, соляной, серной, уксусной кислотами, аммиаком, едким натром, H_2O_2), затем окрашивают клетку со спорой при нагревании и обесцвечивают цитоплазму, а потом дополнительно окрашивают ее контрастным красителем.

Способ окраски по Циль-Нильсону

1. Окрасить фиксированный препарат фуксином Циля: Мазок покрыть белой фильтровальной бумагой, поверх которой нанести несколько капель карболового фуксина и подогреть над пламенем горелки 2-3раза до появления паров, но не до кипения. После охлаждения препарата снять бумажку.

2. Обесцветить препарат 5% серной кислотой – 5 сек.

3. Хорошо промыть водой.

5. Окрасить метиленовой синькой –3-5 мин.

6. Хорошо промыть водой.

7. Просушить препарат фильтровальной бумагой или на воздухе.

Механизм окраски кислотоустойчивыхбактерий по Циль-Нильсону.

Кислотоустойчивость бактериальной клетки связана с наличием микоевой кислоты и большим количеством липидов, что затрудняет окраску. Окрашивание кислотоустойчивых бактерий производят концентрированным раствором красок с подогревом. При последующем воздействии кислот они не обесцвечиваются, сохраняя красный цвет, и таким образом, могут быть дифференцированы от других бактерий.

Оборудорвание: микроскоп, предметные стекла, бактериологическая петля, фильтровальная бумага, растворы красителей, иммерсионное масло, стерильные пипетки, спиртовки, 1% раствор серной кислоты, культуры бактерий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Оркин,* В.Ф. Методические указания к лабораторным работам по микробиологии для студентов 270900 – «Технология мяса и мясопродуктов»/ сост. В.Ф. Оркин, Л.В. Карпунина, З.Ю. Хапцев, А.А. Щербаков. Изд-во ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2006. -104 с.

2. *Кузнецова*, Е.А. Учебно-методическое пособие предназначено для самостоятельной подготовки и выполнения лабораторных работ по курсу «Микробиология» студентами специальностей 270300 «Технология хлеба, кондитерских и макаронных изделий» / Е.А. Кузнецова. Орёл: ОрёлГТУ, 2005. – 188 с.

ТЕМА 5 МОРФОЛОГИЯ ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ И ДРОЖЖЕВОЙ КЛЕТКИ

Цель: Ознакомить студентов с морфологией некоторых плесневых грибов и дрожжей, и техникой их микроскопирования.

Изучение морфологии грибов

Грибы относят к эукариотам. С растениями их сближает наличие ядер, клеточных стенок и вакуолей, но у них нет хлорофилла, поэтому они являются гетеротрофами (растут в аэробных условиях и получают энергию путем окисления органических веществ). Грибы могут быть сапрофитами или паразитами.

Вегетативное тело гриба состоит из разветвленных нитей - гиф толщиной около 5 мкм - мицелия, или грибницы. Мицелий может быть субстратным или погруженным – развивается в толще субстрата, и поверхностным или воздушным – развивается на поверхности среды.

У высших грибов гифы разделены поперечными перегородками-септами на клетки, у низших мицелий одноклеточный. Иногда мицелий образует ризоиды, выросты, при помощи которых гриб крепится к субстрату и получает питательные вещества.

Изучение размножения грибов

Размножение грибов происходит половым и бесполым путем.

Половое размножение начинается с образования в специальных клетках-гаметангиях половых клеток или гамет. Мужские гаметангии – антеридии, женские – оогонии. После слияния гамет происходит образование спор. Бесполое размножение осуществляется:

1. Фрагментацией мицелия;
2. Почкованием (реже делением);
3. Спорами.

При фрагментации происходит разлом гиф на отдельные клетки – артроспоры или оидии. У некоторых грибов такие клетки окружаются толстой стенкой, в этом случае их называют хламидиоспорами.

Почкование или деление является характерным видом бесполого размножения дрожжей.

Наиболее широко распространено бесполое размножение спорами. Существует 2 способа образования спор бесполым путем. Первый способ заключается в следующем: споры отшнуровываются на концах гиф – это конидиоспоры или экзоспоры. Конидии, обычно шарообразные, образуются на гифах-конидиеносцах. Конидии могут быть одиночными – по одной на каждом ответвлении конидиеносца и множественными, если образуется несколько конидий. Конидиеносцы бывают простые и разветвленные. Разветвленные имеют на конце ветвления верхушечные клетки, называемые стеригмами. Второй способ – споры образуются в спорангиях – это спорангиоспоры или эндоспоры. Они образуются в специальных спорангиях с оболочкой. Спорангии находятся на гифах-спорангиеносцах. При разрыве спорангия эндоспоры освобождаются и, попав на среду, прорастают.

Классификация грибов

К царству *Mycota* или *Fungi* (Грибы) относят 2 отдела: отдел *Myxomycota* (слизевые грибы) и отдел *Eumycota* (истинные грибы). Истинные грибы распределены на 6 классов: 1) класс *Chytridiomycetes* (хитридиомицеты), 2) класс *Oomycetes* (оомицеты), 3) класс *Zygomycetes* (зигомицеты), 4) класс *Ascomycetes* (аскомицеты), 5) класс *Basidiomycetes* (базидиомицеты), 6) класс *Deuteromycetes* (дейтеромицеты). Классы хитридиомицеты, оомицеты и зигомицеты относятся к низшим грибам (фикомицетам), классы аскомицеты, базидиомицеты и дейтеромицеты - к высшим грибам (эумицетам).

Фикомицеты, или низшие грибы. Имеют хорошо развитый ветвистый одноклеточный мицелий. Размножаются половым путем и бесполым, при помощи спор. Представитель класса *Zygomycetes* - мукор (*Mucor mucedo*) развивается в виде войлочного

белого или серого налета на продуктах и навозе. Мицелий мукоровых грибов пронизывает субстрат и частично стелется по его поверхности. Вверх от грибницы отходят гифы - спорангиеносцы, вздувающиеся на концах. Вздутия представляют собой спорангии, они отделяются от спорангиеносцев перегородкой. В спорангиях бесполым путем образуются многочисленные спорангиоспоры. Перегородка куполообразна, поэтому верх спорангиеносца – находится внутри спорангия.

Класс Аскомицеты, или сумчатые грибы. Высшие грибы с многоклеточным или членистым мицелием, образуют споры в "сумках" – асках. Аскомицеты подразделяют на: 1) эуаскомицеты (истинные аскомицеты), у которых сумки со спорами формируются в плодовых телах – плотных образованиях мицелия. Бесполым путем размножаются спорами-конидиями; 2) гемиаскомицеты, не образующие плодовых тел.

К эуаскомицетам относят роды *Penicillum* и *Aspergillus.*

Пенициллы и аспергиллы имеют хорошо развитый многоклеточный мицелий. Размножаются преимущественно конидиальным спороношением. В виде налетов голубого, зеленого цвета встречаются на растительных продуктах, отсыревших изделиях из кожи, обоях.

Грибы рода *Penicillum* называют кистевиками, так как конидии у них формируются на концах разветвленных конидиеносцев, напоминающих кисть.

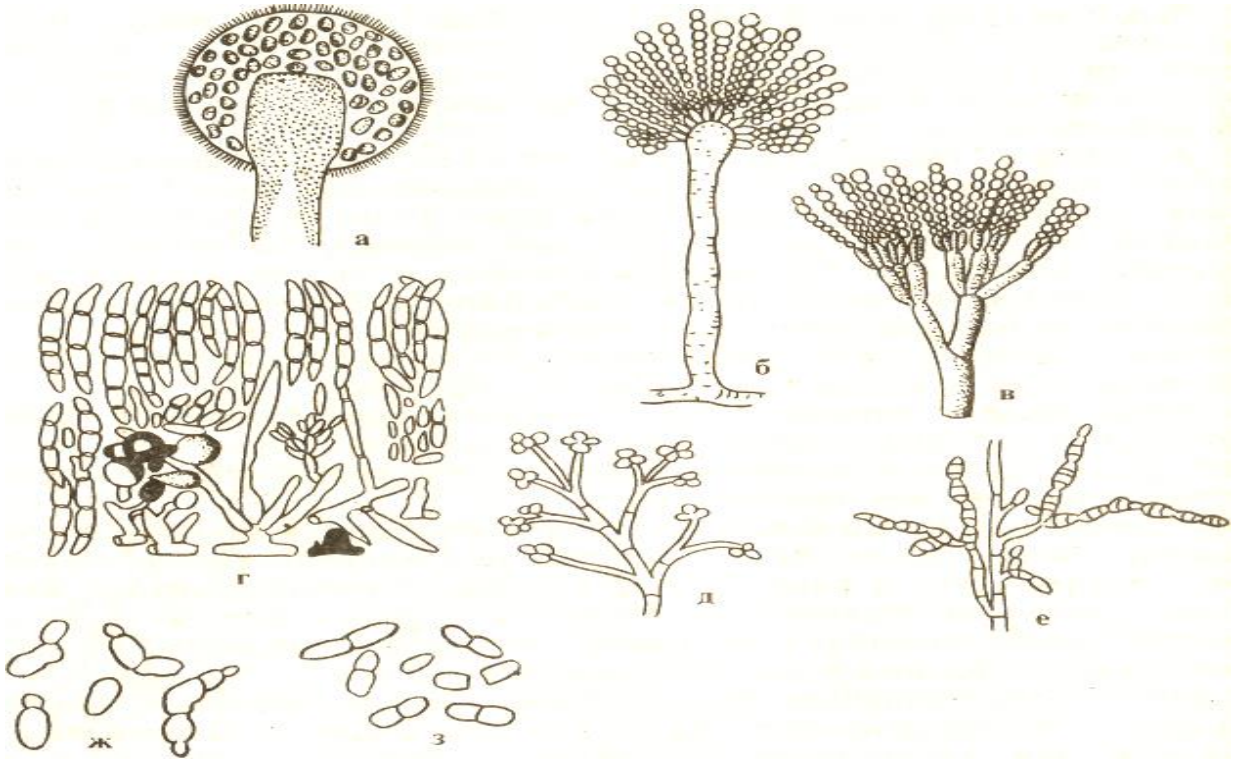

Рисунок 3. Микроскопические грибы родов а - *Mucor*, б - *Aspergillus,* в - *Penicillum*; г - *Fusarium*; д - *Trichoderma*; е – *Alternaria*; ж - *Saccharomyces*; з – *Schizosaccharomyces*

Для грибов рода *Aspergillus*, или леечная плесень, обычны одноклеточные конидиеносцы шаровидно, булавовидно или грушевидно вздутые. На них располагаются параллельно друг другу короткие кеглеобразные стеригмы, каждая из которых отшнуровывает цепочки конидий. Представитель - *Aspergillus niger*.

У гемиаскомицетов плодовые тела отсутствуют. К гемиаскомицетам относят дрожжи.

Это округлые клетки диаметром 8 - 15 мкм. Форма клеток эллипсовидная, грушевидная, округлая, цилиндрическая. В мелкозернистом содержимом живых дрожжей хорошо заметны крупные прозрачные вакуоли, занимающие иногда центральное

положение. Размножаются в основном вегетативным способом – почкованием и делением. К почкующимся дрожжам относят дрожжи рода сахаромицеты (*Saccharomyces*), к делящимся - виды рода шизосахаромицеты (*Schizosaccharomyces*).

Класс Дейтеромицеты, или несовершенные грибы. Имеют многоклеточный мицелий, но у них нет полового процесса. Размножаются бесполым путем при помощи конидий или вегетативно участками гиф. В природе широко распространены представители родов *Fusarium, Trichoderma, Alternaria*. Встречаются на растительных остатках, плодах, семенах и в почве.

Среди грибов рода *Fusarium* есть как сапрофиты, живущие в почве и на растительных остатках, так и паразиты, вызывающие заболевания многих видов растений (увядание, гнили корней, стеблей, плодов, полегание сеянцев древесных и кустарниковых пород, болезни семян) и животных. Колонии отдельных видов фузариума на питательных средах (сусло-агар) разнообразны по структуре: они могут быть рыхлыми; ватообразными, пышными воздушными или плотными пленчатыми. Колонии бывают белые или различных тонов розового или желтого цвета. Нередко питательная среда тоже окрашивается в разные цвета и оттенки от розового до коричневого. Размножаются конидиоспорами. Конидиеносцы разветвленные, а сами конидии, так называемые макроконидии, очень своеобразны. Они заострены на концах, продолговатые согнутые или серповидные, с несколькими перегородками. У многих видов фузариума образуются еще овальные, мелкие, бесцветные, чаще одноклеточные микроконидии.

Дрожжи – это округлые клетки диаметром 8 - 15 мкм. Форма клеток эллипсовидная, грушевидная, округлая, цилиндрическая. В мелкозернистом содержимом живых дрожжей хорошо заметны крупные прозрачные вакуоли, занимающие иногда центральное положение. Размножаются в основном вегетативным способом – почкованием и делением. К почкующимся дрожжам относят дрожжи рода сахаромицеты (Saccharomyces), к делящимся - виды рода шизосахаромицеты (Schizosaccharomyces). Для дрожжей также свойственно размножение половым путем с образованием спор. При половом процессе слияние вегетативных клеток дрожжей ведет к образованию клеток-сумок со спорами.

Наиболее окультурены дрожжи пивные или пекарские – Saccharomyces cerevisiae, осуществляющие спиртовое брожение с выделением углекислого газа. Форма их разнообразна, размножаются они, как и все сахаромицеты, почкованием и аскоспорами. При почковании на материнской клетке возникает маленькая выпуклость – "почка" – это дочерняя клетка, в которую переходит одно ядро, клетка увеличивается в размерах и отделяется. Если условия для такого размножения благоприятны, процесс идет очень быстро. Иногда клетки после почкования не успевают разъединяться и возникает псевдомицелий (ложный мицелий). В пекарских дрожжах обычно присутствуют две расы: одна представлена округло-эллипсовидными клетками, быстро разъединяющимися при почковании; другая – удлиненно-цилиндрическими, образующими при почковании ветвистые кустики (псевдомицелий).

Дрожжи

Дрожжи эукариотические организмы, имеют дифференцированное ядро. На рис. 4 приведена схема строения дрожжевой клетки. Дрожжевая клетка окружена клеточной оболочкой 13, которая является механическим барьером, сохраняет и придает форму клетке, поддерживает внутриклеточное давление. Структура клеточной стенки многослойная, пористая, через поры клеточной стенки из внешней среды проникают низкомолекулярные вещества (вода, соли, сахара, углеводороды и др.) и выводятся продукты метаболизма (диоксид углерода, аминокислоты, спирты, кислоты и др.). К внутренней поверхности клеточной стенки прилегает цитоплазматическая мембрана 1. Она выполняет роль осмотического барьера, через который путем диффузии и с помощью ферментативных систем проходит активный обмен веществами с внешней средой.

Рисунок 4. Схема поперечного разреза дрожжевой клетки: 1 — цитоплазматическая мембрана; 2 — цитоплазма; 3 — аппарат Гольджи; 4 — эндоплазматическая сеть; 5 — жировые капельки; 6 — митохондрия; 7 — ядро; 8 — рубец, где отпочковалась клетка; 9 — ядрышко; 10 — гранулы волютина (метахроматина); 11 — рибосомы; 12 — вакуоль; 13 — клеточная оболочка

Мембрана окружает цитоплазму 2, которая представляет собой полужидкую коллоидную систему внутри клетки. В ней находятся все структурные элементы и включения клетки, протекают биохимические процессы жизнеобеспечения.

Ядро дрожжевой клетки 7 имеет округлую форму размером 1 – 2 мкм. Основные соединения ядра – ДНК, РНК. ДНК является «носителем» и «хранителем» наследственной информации клетки. При размножении дрожжей ДНК материнской клетки удваивается и передается в дочернюю клетку. Информация «списывается» с помощью информационных РНК доставляется через поры мембраны ядра к различным структурам клетки, в частности рибосомы.

Рибосомы 11 имеют размер 15 – 20 нм и представляют собой мелкие сферические структуры, с помощью которых синтезируется белок, их количество достигается в клетке 104 – 105.

Хранилищем резервных веществ в клетке является мембранное образование – вакуоль 12. Гранулы полифосфата (волютин), гликоген, капельки жира – это резервные вещества, выполняющие роль энергетического запаса. Эндоплазматическая сеть 4 представляет собой мембранное образование в виде мелких канальцев и пузырьков, которые локализуются в определенных участках цитоплазмы. Она является носителем различных ферментных систем, катализирующих синтез белковых и липидных компонентов клеточных органелл.

Аппарат Гольджи 3 также является мембранным образованием, состоящее из ориентированных определенным образом стопок дискоидных цистерн, окруженных массой мелких пузырьков. Белки из полости эндоплазматического ретикулума входят в аппарат Гольджи, где подвергаются разнообразным ковалентным модификациям, в результате которых приобретают конечные зрелые формы. Аппарат Гольджи направляет их в многочисленные внутреклкточные и внеклеточные «пункты назначения». Правильная сортировка белков и их модификация перед избирательным выделением – одна из главных функций аппарата Гольджи.

Энергетические нужды клетки обеспечивают митохондрии 6 – полуавтономные структуры диаметром 0,2 – 2 мкм и длиной 0,5 – 7 мкм.

Для изучения органелл дрожжевой клетки и способов ее размножения на лабораторном занятии необходимо приготовить препараты и провести их микроскопирование.

Препарат «раздавленная капля». На середину чистого предметного стекла наносят небольшую каплю воды, бульона или физиологического раствора (0,5%-ный раствор NaCl). В нее вносят петлей или иглой исследуемый материал, после чего хорошо размешивают до получения слабомутной суспензии.

При рассмотрении микроорганизмов, выросших в жидких средах, каплю воды на предметное стекло можно не наносить. Покровное стекло ставят на ребро у края капли с микроорганизмами и постепенно опускают, стараясь, чтобы между стеклами не образовались пузырьки воздуха, мешающие микроскопированию. Ручкой петли прижимают покровное стекло к предметному. Излишек жидкости, выступающий за края покровного стекла, удаляют полоской фильтровальной бумаги. Приготовленный препарат сразу же исследуют, так как жидкость высыхает и микроскопирование затрудняется.

В препарате «раздавленная капля» в светлом и темном поле можно установить форму и размеры клеток, их физиологическое состояние, характер размножения, расположения спор, наличие запасных питательных веществ в клетке, подвижность. В последнем случае необходимо отличать истинное движение от броуновского, при котором

клетки остаются на месте, совершая колебательные движения, или перемещаются по току жидкости.

Спорообразование у дрожжей наблюдается у молодой по возрасту культуры, предварительно выращенной в течение 1 – 2 сут. на богатых средах; у активно растущих дрожжей на голодных средах или гипсовых блоках, при хорошей аэрации и повышенной влажности; при инкубации дрожжей при температурах несколько меньших по сравнению с оптимальными (20 – 25°С) 4 – 6 недель.

Споры у дрожжей обнаруживают путем окраски спор дрожжей в фиксированном препарате. Фиксированными считают клетки микроорганизмов, в которых прерваны жизненные процессы, но полностью сохранена тонкая структура. Окрашенные фиксированные клетки и детали их строения резче выделяются на фоне препарата, что облегчает изучение формы, размеров, внутренних элементов (ядра, оболочки, спор, включений), упрощает подсчет количества клеток. Фиксированные препараты обычнорассматривают с иммерсией. Приготовление окрашенных фиксированных препаратов состоит из следующих этапов: приготовление мазка, высушивание, фиксация и окраска мазка.

Приготовление мазка. Мазки готовят на чистых обезжиренных предметных стеклах. Предметные стекла берут пинцетом или пальцами за ребра и проносят через пламя горелки, слегка обжигая, после чего кладут обожженной поверхностью кверху на мостик над ванночкой. Наносят каплю воды и вносят в нее петлей дрожжи. Тщательно размешивают петлей суспензию и распределяют ее на площади 1 – 2 см2 в виде тонкого ровного слоя.

Высушивание мазка проводят при комнатной температуре на воздухе. Правильно приготовленный мазок высыхает сразу же после нанесения. Если высушивание протекает медленно, препарат мазком вверх высоко поднимают над пламенем горелки и осторожно сушат в теплом воздухе без подогрева стекла, иначе клетки деформируются.

Фиксация вызывает гибель клеток микроорганизмов, делает их безопасными (что особенно важно при работе с патогенными культурами) и прочно прикрепляет клетки к стеклу, в результате они не смываются при последующих операциях, лучше окрашиваются, так как становятся более проницаемыми для красителей.

Наиболее простым и распространенным способом фиксации является термическая обработка. Для этого предметное стекло мазком вверх 3 – 5 раз проносят через наиболее горячую часть пламени горелки. Предметное стекло нагревают 2 – 3 с, пока не возникнет ощущение легкого жжения, если приложить его к кисти руки. Более длительная термическая фиксация может изменить структуру микробных клеток и их форму. Недостаточно хорошо зафиксированный мазок смывается со стекла при последующей обработке.

Окрашивание мазка. Готовый препарат заливают карболовым фуксином Циля и нагревают 2 – 3 мин до появления паров. Затем препарат обесцвечивают, погружая в 2%-ный раствор молочной кислоты или 95%-ный этанол, содержащий 1 мл концентрированной соляной кислоты в 100 мл этилового спирта. Препарат промывают водой и докрашивают 3 – 5 мин 1%-ным раствором метиленового синего или нильского голубого, после чего промывают водой.

Задание

1. Рассмотреть грибы рода *Aspergillus, Penicillium* и *Mucor*, выращенные на мясопептонном агаре на малом увеличении.
2. Приготовить и рассмотреть препараты из мицелия с сильной сухой системой.
3. Зарисовать микроскопическую картину и подписать названия родов микроскопируемых грибов, отметить структурные элементы грибов – гифы, спорангие- и конидиеносцы, спорангии (у мукора) и споры (у эуаскомицетов).

Оборудование: десятидневные культуры плесневых грибов из родов *Aspergillus, Penicillium, Mucor* на чашках Петри со средой Сабуро; метиленовая синька; газовые горелки; бактериальные петли; пинцеты; предметные и покровные стёкла; световые микроскопы с сухими и иммерсионными объективами; настольные лампы, предметные и покровные стёкла, дрожжи, выращенные на плотной и жидкой питательной среде, физиологический раствор, фуксин Циля, 95% этиловый спирт, соляная кислота, , фильтровальная бумага.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Карпунина,* Л.В. Учебно-методическое пособие для выполнения лабораторных работ по дисциплине «Микробиология и иммунология» для студентов направления 111100.62 - "Зоотехния", профиль подготовки «Непродуктивное животноводство» / Л.В. Карпунина, Е.А. Горельникова. – Саратов: Изд-во ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2012.

ТЕМА 6 ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ. МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ.

Цель: Ознакомит студентов с питательными средами, применяемыми в микробиологии и с методами стерилизации.

Питательные среды применяются в микробиологической практике для выращивания микробов в лабораторных условиях. Для нормального развития микроорганизмов питательная среда должна содержать в определенных количествах все необходимые для них элементы.

Для культивирования бактерий в лабораторных условиях пользуются питательными средами различного состава. Их классифицируют по консистенции – плотные, жидкие и полужидкие; по происхождению их подразделяют на: естественные (натуральные) и синтетические; по назначению – универсальные (общие, общеупотребительные), элективные, дифференциальные, среды обогащения и специальные.

Плотные питательные среды используют для учета количества бактерий, выделения чистой культуры и других целей. Такие среды готовят из жидких, добавляя 1,5 - 2,5% агар-агара или 10 - 15% желатины. При приготовлении полужидких сред вносят 0,1 - 0,2 % агар-агара. Агар-агар - это растительный коллоид, получаемый из некоторых морских водорослей. В его состав входят, главным образом, полисахариды. Желатина - кислый азотсодержащий продукт, добываемый при выварке костей и хрящей. Для выращивания микроорганизмов, усваивающих органические формы азота, часто употребляют мясо-пептонные среды: мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА) и мясо-пептонную желатину (МПЖ).

Наиболее универсальными питательными средами являются мясо-пептонный бульон и мясо-пептонный агар. Пептон, входящий в состав этих сред, содержит необходимые для питания микробной клетки источники азота, углерода и зольных элементов, а мясная вода обеспечивает потребность бактерий в дополнительных факторах роста (витамины). Для приготовления мясо-пептонного агара к мясо-пептонному бульону добавляют от 2 до 3,5 % сухого агара. Количество добавляемого агара зависит от его качества и от необходимости приготовить более или менее плотную питательную среду. Агар плавится при температуре, близкой к 100 °С, и застывает при температуре 40-50 °С.

После прибавления к мясо-пептонному бульону необходимого количества сухого агара жидкость кипятят до полного растворения агара или помещают в автоклав при температуре 115-121 °С. Мясо-пептонный агар фильтруют в горячем виде, проверяют pH среды (pH среды должен быть равен 7,2-7,6), разливают по пробиркам и колбам, закрывают пробками и стерилизуют при температуре 121 °С в течение 30 минут при давлении 1 атм.

Для получения большей поверхности для культивирования бактерий приготовляют так называемый скошенный агар, для чего расплавленный агар в пробирках сразу после стерилизации укладывают на стол остывать в скошенном положении. После застывания агар отдает конденсационную воду, собирающуюся внизу пробирки.

Естественными обычно называют среды, которые состоят из продуктов животного или растительного происхождения и имеют сложный неопределенный химический состав. Их основа – различные части растений, животные ткани, солод, дрожжи, навоз, почва, вода морей, озер и минеральных источников. Большинство таких сред используют в виде экстрактов или настоев. Химический состав естественных сред сложен и непостоянен, существенно колеблется в зависимости от сырья и способа приготовления сред. Это заметно влияет на рост микроорганизмов. Естественные среды используют, главным образом, для поддержания культур микроорганизмов, накопления биомассы и диагностических целей. Однако среда с неопределенным составом малопригодна для

изучения физиологии обмена веществ микроорганизмов, поскольку не позволяет учесть потребление ряда компонентов среды, а также выяснить, какие вещества синтезируют микроорганизмы.

Синтетическими называют среды, в состав которых входят в точно указанных концентрациях только известные химически чистые соединения. Данные среды по составу бывают простыми или с относительно сложным набором компонентов. Синтетические среды широко используют для исследований, связанных с изучением обмена веществ микроорганизмов.

Существуют так называемые полусинтетические среды, относящиеся к средам с неопределенным составом. В них наряду с соединениями известной химической природы входят вещества неопределенного состава. Например, в мясо-пептонную среду кроме сложных, неопределенных по химическому составу веществ (мясной бульон), иногда входят пептон, глюкоза или сахароза, поваренная соль, фосфат калия; картофельные среды содержат глюкозу и пептон. Полусинтетические среды широко используют в микробиологической практике для получения витаминов, антибиотиков, аминокислот и других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

Для выделения чистых культур некоторых бактерий применяют элективные или избирательные питательные среды. Элективные среды содержат ингибиторы сопутствующей микрофлоры (антибиотики, красители, соли тяжелых металлов), которые не влияют на определенный вид или род микробов. Зная физиологические особенности соответствующей группы микробов, можно подобрать такие условия культивирования (состав, активную кислотность среды, условия аэрации, температуру и др.), при которых будут развиваться лишь представители данной группы. Элективные среды позволяют работать в лаборатории и на производстве без предварительной стерилизации среды. Эти среды применяют, главным образом, для выделения микроорганизмов из мест их естественного обитания и получения накопительных культур. В элективной среде должны быть созданы благоприятные условия для размножения выделяемых бактерий и неблагоприятные для сопутствующей флоры. Так, например, элективной средой для выделения сальмонелл является висмут-сульфитный агар, для стафилококков - желточно-солевой агар, для холерного вибриона - щелочная пептонная вода, для дифтерийной палочки - свернутая сыворотка и т.д.

Другая разновидность специальных сред - дифференциально-диагностические среды. Они позволяют изучить ферментативную активность микроба и помогают в определении вида (идентификации) выделяемой культуры. Дифференциально-диагностическими средами пользуются, главным образом, при работе с бактериями кишечно-тифозной группы (среды Эндо, Левина и др.). Среда Эндо состоит из мясо-пептонного агара, лактозы и индикатора (спиртового раствора основного фуксина). Среду разливают в стерильные чашки Петри и употребляют в день приготовления. Колонии кишечной палочки на среде Эндо имеют фуксиново-красный цвет, так как этот микроб ферментирует лактозу. Среда Левина состоит из мясо-пептонного агара, лактозы и индикатора (эозин и метиленовый синий). Среда фиолетового цвета, колонии кишечной палочки - темно-синего. Приготовление дифференциально-диагностических сред из готового сухого препарата сводится к следующему: навеску среды растворяют в дистиллированной воде и после 5-минутного кипячения разливают в стерильные чашки Петри.

Специальные среды – это наиболее оптимальные среды для выращивания бактерий не размножающихся на общеупотребительных средах (кровяной агар, сывороточный агар, среда Китта-Тароцци и др.).

Микроорганизмы, помещенные в ограниченный объем питательной среды, довольно быстро расходуют все питательные вещества, выделяя токсичные продукты обмена, вследствие чего среда становится непригодной для нормального роста микробов. Поэтому их рост постоянно поддерживают, пересевая их на новую питательную среду. При

исследовании морфологических и биологических свойств микробов тоже необходимы посевы на свежие среды, так как они проводятся на культурах определенного возраста. При пересеве их с одной среды на другую или при извлечении части культуры для приготовления мазка необходимо соблюдать условия, обеспечивающие предохранение чистой культуры микроорганизмов от загрязнения посторонними микробами.

Стерилизация (лат. sterilis – бесплодный). Существуют различные методы стерилизации.

Стерилизация огнем – прокаливание и *фламбирование.* При этом стерилизуются только рабочие части инструментов, помещенные в пламя. Прокаливанием стерилизуют непосредственно на пламени, или перед употреблением мелкие металлические предметы (платиновые петли, иглы, шпатели, ножницы, ланцеты, пинцеты). Фламбируют либо стеклянные предметы, либо более крупные, чем петли и иглы, инструменты. Перед помещением в пламя стерилизуемые части предметов помещают в спирт и используют после того, как спирт выгорит.

Стерилизация сухим жаром. Применяют для обработки посуды и сухих материалов. Нагревают их в течение 1 - 2 часов при 170° С с того момента, как установлена необходимая температура, в печи Пастера или в электросушильных шкафах с нагревом до 200° С. Температура выше 170° С не рекомендуется: ватные пробки и бумага начинают разрушаться, буреют, становятся ломкими. Перед стерилизацией стеклянную посуду закрывают ватными пробками, отверстия колб обвязывают бумагой, чашки, пробирки, пипетки, вату, марлю заворачивают в бумагу или помещают в особые футляры и пеналы, в которых стерильная посуда может храниться после стерилизации.

По окончании стерилизации шкаф открывают только после того, как температура в нем снизится до комнатной, иначе под действием холодного наружного воздуха стекло может лопнуть.

Стерилизация текучим паром. Текучим паром (100 °С) обрабатывают предметы, портящиеся от сухого жара, и некоторые питательные среды, не выдерживающие более высокой температуры (среды с углеводами, МПЖ, молоко). Данную стерилизацию выполняют в кипятильнике Коха. Стерилизацию в течение трех дней по 30 минут ежедневно называют дробной. Кипятильник Коха представляет собой высокий металлический цилиндр с двойным дном, свободно закрывающийся конусообразной крышкой с отверстием для термометра. Снаружи цилиндр покрыт асбестом или линолеумом. На дно кипятильника наливают воду, устанавливают подставку с отверстиями для прохождения пара, на которую помещают стерилизуемые предметы. Продолжительность стерилизации отсчитывают с момента интенсивного выхода пара из-под крышки и повышения температуры до 100° С. При однократном прогреве при температуре 100° С за 30 минут погибают вегетативные клетки, споры же многих микроорганизмов остаются жизнеспособными. После такого прогрева среду помещают на 24 часа в термостат при 28 - 30° С. Споры, сохранившиеся при первом нагревании, успевают за это время прорасти в вегетативные формы, которые при последующем нагревании погибают. Всю операцию повторяют три раза.

Стерилизация насыщенным паром под давлением. Наиболее быстрый и надежный способ стерилизации, при котором гибнут самые устойчивые споры. Так стерилизуют большинство питательных сред, посуду. Обработку насыщенным паром выполняют в автоклаве. Надежной стерилизации достигают нагреванием при 121°С, давлении 1 атм. в течение 20-30 минут. Питательные среды, содержащие углеводы, стерилизуют при 0,5 атм. (112° С). Стерилизацию ведут следующим образом. Наливают воду в автоклав, помещают в него стерилизуемые предметы, завинчивают крышку и начинают подогрев. Кран оставляют открытым до тех пор, пока весь воздух, находящийся в автоклаве, не будет вытеснен парами воды. Когда пар начнет выходить из крана непрерывной струей, кран закрывают, доводят давление пара в автоклаве до 1 атм. и поддерживают на этом уровне 20 - 30 минут. Затем нагрев прекращают, ждут, пока стрелка манометра дойдет до

0, осторожно открывают кран и спускают пар. Только потом отвинчивают крышку автоклава. Если кран будет открыт раньше, чем упадет давление, то жидкость в стерилизуемых сосудах закипит и вытолкнет из них пробки. Для контроля за работой автоклавов среди стерилизуемых предметов можно закладывать специальные тесты-ампулы, содержащие химические вещества, которые плавятся при определенной температуре. Например, у бензонафтола температура плавления 110°С, у антипирина 113°С. Автоклав используют и для дробной стерилизации текучим паром. В этом случае крышку не завинчивают, чтобы дать свободный выход пару.

Пастеризация. Представляет собой неполную или частичную стерилизацию, что означает неполное уничтожение микрофлоры. Пастеризация применяется в основном для обработки пищевых продуктов, меняющих качества при сильном нагревании (вино, молоко и т.д.). Пастеризация достигается нагреванием при 65-80 °С в течение 30 минут с последующим быстрым охлаждением до 10 – 11 °С. Метод был предложен Л. Пастером для обработки вин в целях предотвращения их порчи.

Стерилизация фильтрованием через мелкопористые фильтры. Применяют для обработки сред, компоненты которых легко разлагаются при нагревании. Через мелкие поры фильтра могут пройти только ультрамикробы (вирусы, бактериофаги). Наиболее часто используют фильтры из каолина (полые цилиндры, закрытые с одной стороны), например, фильтры Зейтца (рис. 5).

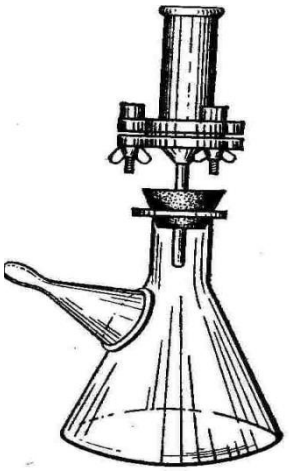

Рисунок 5.
Фильтр Зейтца

Чтобы жидкость прошла через такой фильтр, необходимо создать разницу давления по обе стороны цилиндра. Этого достигают нагнетанием или откачиванием воздуха при помощи масляных насосов. Фильтр соединяют с приемником для жидкой среды, которым служит колба Бунзена. Оттянутый конец колбы закрывают ватной пробкой. Смонтированные фильтр с приемником стерилизуют. Среду для стерилизации наливают в сосуд, в который помещают фильтр, а колбу Бунзена с ватной пробкой соединяют с насосом (масляным или водоструйным) и откачивают воздух. Поскольку внутри колбы давление становится ниже, чем над поверхностью фильтра, жидкость под давлением проходит через фильтр в приемник. Бактерии остаются с внешней стороны фильтра. Неудобство метода заключается в медленной фильтрации и необходимости частой очистки фильтров.

Стерилизация ультрафиолетом. Ультрафиолетовые бактерицидные лампы используют для стерилизации воздуха в помещениях. Стерилизация ультразвуком (холодная стерилизация) применяется для стерилизации инструментов, перевязочного материала, биопрепаратов и т.д.

Оборудование: питательные среды для демонстрации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Карпунина*, Л.В. Учебно-методическое пособие для выполнения лабораторных работ по дисциплине «Микробиология и иммунология» для студентов направления 111100.62 - "Зоотехния", профиль подготовки «Непродуктивное животноводство» / Л.В. Карпунина, Е.А. Горельникова. – Саратов: Изд-во ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2012.

ТЕМА 7 МЕТОДЫ ПОСЕВА И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель: ознакомить студентов с понятием «анаэробные» микроорганизмы, методами создания анаэробиоза и используемым при создании данных методов оборудованием и средами.

Методы создания анаэробных условий

Отношение микроорганизмов к кислороду можно определить методом посева на плотные питательные среды. Аэробные микроорганизмы будут расти на поверхности среды, факультативные анаэробы – как на поверхности, так и вдоль укола, облигатные анаэробы будут расти в глубине питательной среды.

Культивирование анаэробов производится в бескислородных условиях, которые создаются различными приемами. Наиболее простой способ - механическая защита микроорганизмов от воздуха путем выращивания их в высоком слое жидкой среды (в пробирке до 10-15 мл). Для этого поверхность среды заливается тонким слоем стерильного вазелинового масла или парафина. Диффузия кислорода из воздуха в жидкие среды уменьшается при загущении среды агар-агаром (0,2–0,3 %). При использовании плотных сред посев осуществляется в чашках Петри под агар. Строгие анаэробные микроорганизмы выращивают в специальных аппаратах - стеклянных вакуумных эксикаторах или анаэростатах. Вакуумный эксикатор и анаэросат представлены на рисунках 6 и 7.

Для культивирования анаэробных микроорганизмов создают условия анаэробиоза химическими, физическими, биологическими методами.

Химические методы подразделяются на 2 группы.

Первая группа: свободный кислород связывается химическими реагентами в замкнутом пространстве: эксикаторе, анаэростате. Реагенты: 1) гипосульфит натрия с углекислой содой в соотношении 1:1; 2) пирогаллол со щелочью: 1 г пирогаллола + 1 $см^3$ 10% КОН – эта смесь поглощает и углекислый газ.

Вторая группа методов заключается в прибавлении к среде редуцирующих веществ, которые связывают кислород в субстрате. Например, среда Кит-Тароцци. Эта среда представляет собой мясопептонный бульон или молоко, содержащий кусочек печени. Её стерилизуют при 1 атмосфере. Мясной кусочек содержит аминокислоту цисцеин, которая связывает кислород.

Рисунок 6. Анаэростат на 10 чашек Петри

Рисунок 7. Вакуумный эксикатор

Физические методы – это удаление кислорода кипячением. Пробирки заливают маслом и стерилизуют в сушильном шкафу. Воздух из замкнутого пространства также выкачивают насосом, пустота заполняется азотом или аргоном. Метод Вейон-Веньяля – в пробирку с мясопептонном агаром вносят взвесь микробов и этим агаром заполняют стерильные трубки длинной 20 см и диаметром 0,75 см. Один конец этой трубки оттянут в виде капилляра и тонкий конец запаян. Ставят в термостат и через 24 часа будут видны колонии микроорганизмов. Трубочку распиливают и извлекают микроорганизмы.

Биологические методы. Например, метод Фортнера – это совместное выращивание анаэробных и аэробных микроорганизмов. Аэробы поглощают весь кислород. Другим методом является заражение мышей *Clostridium botulinum*, а затем делают мазки отпечатки печени

Задание.

Рассмотреть устройство вакуумного эксикатора, анаэростата.

Произвести посев культуры анаэробных бактерий в пробирки на среду Китт-Тароцци, в мясо-пептонный бульон под слой вазелинового масла. Произвести посев факультативных молочнокислых бактерий глубинным методом на чашки Петри.

Оборудование: культуры анаэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, пробирки со средой Китт-Тароцци, колба с лактобакагаром, пробирки с мясо-пептонным бульоном, сверху которого нанесён слой вазелинового масла, анаэростат, вакуумный эксикатор, чашки Петри, пипетки, гипосульфит Na, NaHCO3, пирогаллол, 10% КОН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Карпунина*, Л.В. Учебно-методическое пособие для выполнения лабораторных работ по дисциплине «Микробиология и иммунология» для студентов направления 111100.62 - "Зоотехния", профиль подготовки «Непродуктивное животноводство» / Л.В. Карпунина, Е.А. Горельникова. – Саратов: Изд-во ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2012.

ТЕМА 8 МЕТОДЫ ПОСЕВА И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ АЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТВОЙ КУЛЬТУРЫ АЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ.

Цель: изучить методы выделения чистой культуры и отдельной колонии или одной клетки

Физиологию, биохимические свойства, циклы развития микроорганизмов исследуют, как правило, при работе с чистыми культурами. Чистой, или аксенической, культурой называют такую культуру, которая содержит микроорганизмы одного вида. Умение выделить микроорганизмы одного вида из смешанной популяции, существующей в природе, и поддерживать чистоту культуры - необходимое условие работы с микроорганизмами. Выделение чистой культуры обычно включает три этапа: получение накопительной культуры; выделение чистой культуры; определение чистоты выделенной культуры.

Чистая культура может быть получена из отдельной колонии или из одной клетки.

Выделение чистой культуры из отдельной колонии

Основным методом выделения чистых культур микроорганизмов до настоящего времени является метод, предложенный Р. Кохом. Принцип его заключается в получении чистой культуры из отдельной колонии. Однако этот метод неприменим для выделения микроорганизмов, которые не растут или плохо растут на плотных средах. К числу таких микроорганизмов относятся некоторые бактерии, многие водоросли и простейшие.

При выделении чистой культуры аэробных микроорганизмов накопительную культуру высевают на поверхность плотной среды. Порядок работы следующий. Расплавленную на кипящей водяной бане стерильную питательную среду, содержащую агар или желатину, разливают в стерильные чашки Петри. После того, как среда застынет, на ее поверхность из пипетки наносят каплю накопительной культуры или ее разведения в стерильной воде и стерильным стеклянным шпателем Дригальского распределяют каплю сначала по одной половине поверхности среды в чашке Петри, затем по второй половине, после чего этим же шпателем протирают поверхность плотной среды последовательно во 2-й, 3-й и 4-й чашках. Обычно в первых двух чашках после инкубации наблюдают сплошной рост микроорганизмов, тогда как в последующих - изолированные колонии. Рассевать накопительную культуру можно петлей методом истощающего штриха. В этом случае накопительную культуру или ее разведение отбирают петлей и на поверхности плотной среды проводят штрихи в таком порядке, как указано на рис. 8. Перед каждым новым штрихом петлю стерилизуют в пламени горелки.

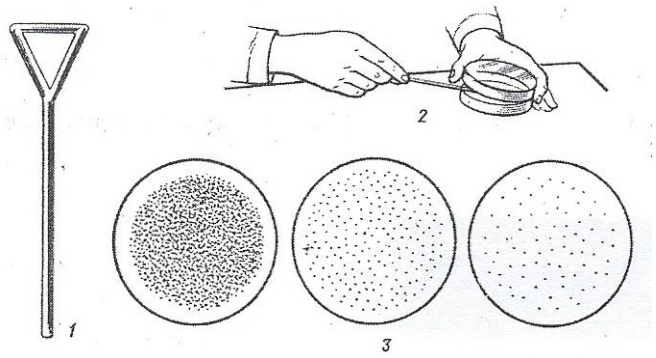

Рисунок 8. Рассев культуры микроорганизмов на поверхность плотной среды шпателем: 1 - шпатель Дригальского; 2 - рассев; 3 – рост микроорганизмов после рассева

После посева чашки помещают в термостат крышками вниз, чтобы конденсационная вода, образовавшаяся на крышке чашки Петри при застывании агара, не помешала получить изолированные колонии. Чашки выдерживают в термостате в течение 1-7 суток

в зависимости от скорости роста микроорганизмов. Выросшие изолированные колонии отсевают петлей на поверхность скошенной плотной среды в пробирки или в жидкую среду.

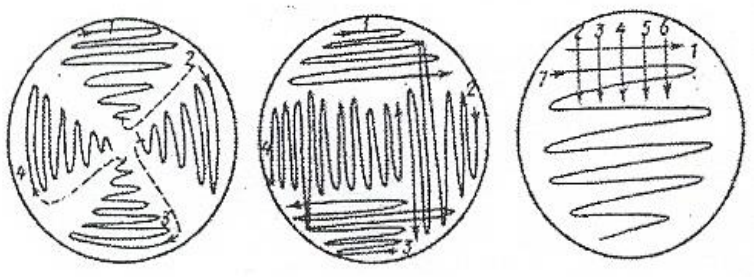

Рисунок 9. Схема рассева культуры микроорганизмов на поверхность плотной среды петлёй

Изолированные колонии аэротолерантных микроорганизмов и факультативных анаэробов чаще получают методом глубинного посева. Для этого плотную питатетельную среду предварительно разливают в пробирки по 15-20 мл и стерилизуют. Непосредственно перед посевом пробирки помещают в кипящую водяную баню, чтобы среда расплавилась. Высев проводят из разведений накопительной культуры в стерильной водопроводной воде. Разведения готовят с таким расчетом, чтобы при высеве 0,5-1,0 мл разведения получить изолированные колонии. Степень разведения определяется плотностью накопительной культуры. Высевы делают, как правило, из трех-четырех последних разведений. Для этого в пробирку с расплавленной и остуженной до 48-50°С агаризованной средой вносят 0,5-1,0 мл одного из разведений накопительной культуры. Посевной материал тщательно перемешивают, вращая пробирку между ладонями. Затем около пламени горелки вынимают из пробирки пробку, обжигая края пробирки в пламени горелки, и быстро выливают содержимое пробирки в чашку Петри. После того как агаризованная среда застынет, чашки Петри помещают в термостат. Колонии, выросшие в толще среды, вырезают стерильным скальпелем или извлекают стерильными капиллярными трубками или просто петлей и переносят в жидкую среду, благоприятную для развития выделяемых микроорганизмов.

Выделение чистой культуры из одной клетки

Чистую культуру из одной клетки можно выделить капельным методом с помощью микроманипулятора или микроселектора.

Капельный метод Линднера используют при работе с крупными микроорганизмами: дрожжами, мицелиальными грибами, водорослями. Порядок работы следующий. Накопительную культуру разводят в стерильной среде с таким расчетом, чтобы в небольшой капле были одиночные клетки микроорганизмов. Затем на поверхность стерильного покровного стекла стерильным стальным пером наносят ряд капель приготовленного разведения. Готовят препарат «висячая капля». Нанесенные на покровное стекло капли просматривают под микроскопом и отмечают те, в которых обнаружена только одна клетка. После этого препарат помещают в термостат во влажную камеру, которой обычно служит чашка Петри с увлажненной фильтровальной бумагой на дне. Через 12-24 ч отмеченные капли вновь микроскопируют. Те капли, в которых наблюдается образование микроколоний, осторожно снимают с покровного стекла кусочками стерильной фильтровальной бумаги и переносят в пробирки со стерильной средой.

Выделение отдельных клеток с помощью микроманипулятора. Микроманипулятор (рис. 10) - прибор, позволяющий с помощью специальной микропипетки или микропетли извлекать одну клетку из суспензии. Эту операцию контролируют под микроскопом. Микроманипулятор имеет два операционных штатива,

между которыми расположен обычный микроскоп. На предметном столике микроскопа установлена влажная камера, в которую помещают препарат «висячая капля». В держателях операционных штативов закреплены микропипетки (микропетли), перемещение которых в поле зрения микроскопа осуществляется с микронной точностью благодаря системе винтов и рычагов. Микропипетки вводят во влажную камеру таким образом, чтобы их концы оказались в висячей капле. Исследователь, глядя в микроскоп, извлекает отдельные клетки микропипетками и переносит их в пробирки со стерильной жидкой средой.

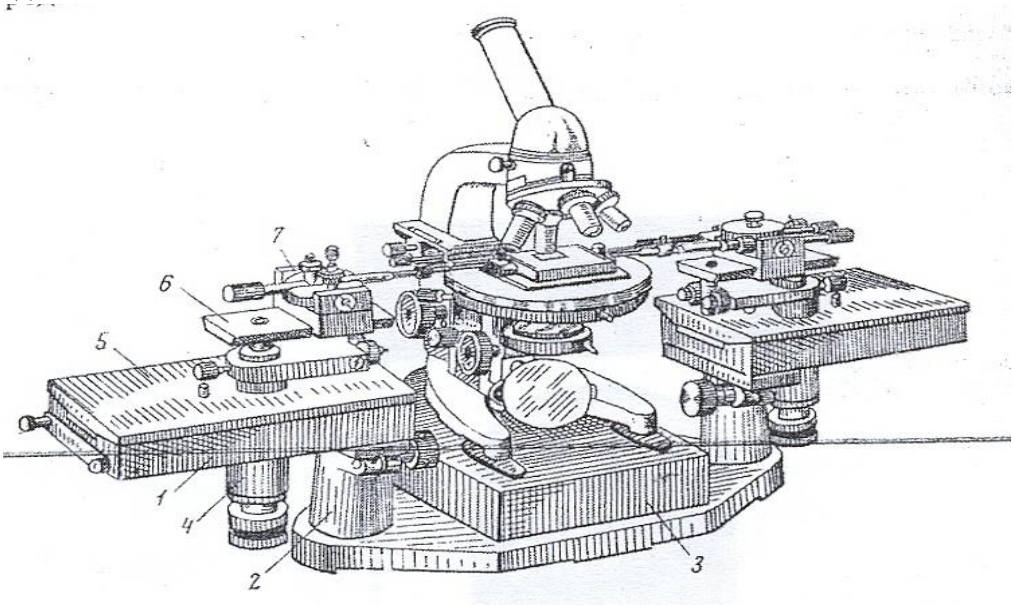

Рисунок 10. Микроманипулятор со скользящими плоскостями конструкции Рейнерта: 1 – нижняя пластина штатива, 2 – колонка, 3 – общая подставка для микроскопа и микроманипулятора, 4, 5 – скользящая пластина с рукояткой, 6 – штатив микроманипулятора для крепления держателя микроинструментов (7)

Выделение отдельных клеток с помощью микроселектора Перфильева. Наиболее существенной частью микроселектора Перфильева является стеклянный микрокапилляр, имеющий строго прямоугольное сечение. Благодаря этому канал капилляра хорошо просматривается даже с иммерсионным объективом. Стерильный капилляр заполняют исследуемой суспензией клеток в агаризованной питательной среде и при большом увеличении микроскопа находят участок с одной клеткой. Специальным приспособлением этот участок капилляра стерильно выбивают в приемник, из которого затем переносят в стерильную среду. Микроселектор Перфильева можно использовать для выделения как крупных, так и мелких микроорганизмов.

Задание: произвести посев выданных культур методом Дригальского и методом Коха.

Оборудование: бактериальные культуры, бактериальные петли, шпатель, чашки Петри с питательной средой, горелки, термостат.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Кузнецова,* Е.А. Учебно-методическое пособие предназначено для самостоятельной подготовки и выполнения лабораторных работ по курсу «Микробиология» студентами специальностей 270300 «Технология хлеба, кондитерских и макаронных изделий» / Е.А. Кузнецова. Орёл: ОрёлГТУ, 2005. – 188 с.

ТЕМА 9 ИДЕНТИФИКАИЦЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПО МОРФОЛОГИЧЕСКИМ, КУЛЬТУРАЛЬНЫМ И БИОХИМИЧЕСКИМ ПРИЗНАКАМ.

Цель: изучить морфологические, биохимические и культуральные признаки выданной преподавателем культуры микроорганизмов.

Методы идентификации бактерий

Для установления принадлежности бактерий к определённому роду, виду следует определить их основные свойства. Эти свойства касаются их морфологии, тинкториальных особенностей, различных проявлений жизнедеятельности (характера роста и размножения, процессов обмена), антигенной структуры, взаимоотношений с бактериофагом. Таким образом, идентификация культуры любых бактерий строится на определении их основных свойств.

Схема идентификации бактерий:

1. Изучение морфологических свойств.
2. Изучение культуральных свойств.
3. Определение биохимической активности.
4. Дополнительные тесты (серологические методы анализа)

Характер роста на скошенном агаре

Описывают следующие признаки: форму роста (рост по штриху, «ползучий», затягивающий рост); край штриха (ровный, лопастной, волокнистый); поверхность (гладкая, блестящая, матовая, шероховатая); пигментация (окраска штриха, штриха и всей среды); консистенция (определяется тем, как снимается материал со скошенного агара: мягкая, вязкая, слизистая (тянется за петлёй), плотная, спаянная с агаром).

Характер роста в жидкой питательной среде (МПБ).

Бульонную культуру берут осторожно, не взбалтывая её. При наблюдении отмечают: наличие плёнки, характер её (складчатая, толстая, рыхлая, маслянистая, опускающиеся нити); осадок, характер его (осадок на дне, стенках, мелкий, крупнохлопчатый); общее помутнение.

Изучение культуральных свойств.

Морфология колоний изучается при посеве на плотных средах в чашке Петри.

Признаки, обнаруживаемые в проходящем свете (рассматривают чашку со стороны дна, держа её на уровне глаз): величина колоний в мм (крупная, мелкая, точечная); форма (правильно круглая, неправильно круглая); прозрачность (прозрачная, непрозрачная, полупрозрачная).

Признаки, обнаруживаемые в отражённом свете (рассматривают чашку со стороны посева, под дно чашки рекомендуется подложить лист белой бумаги): высота, рельеф (плоская, выпуклая, с вдавлением в центре и т.д.); характер поверхности (гладкая, влажная, матовая, шероховатая); цвет (пигментация – цвет).

Признаки, обнаруживаемые под малым увеличением. Укладывают чашку вверх дном на предметный столик и рассматривают под малым увеличением микроскопа. Отмечают: характер края (ровный, фестончатый, зазубренный, локонообразный); структуру (гомогенная, зернистая, волокнистая).

Каждому виду микроорганизма свойственен определённый характер колонии. Нередко описание имеет дифференциальное значение, поэтому описание колоний проводят самым тщательным образом.

При приготовлении препаратов для микроскопии, касаясь петлёй колоний, отмечают консистенцию. Колония может быть мягкой, вязкой, слизистой (тянется за петлёй), плотной, спаянной с агаром и т.д.

Задание: Провести идентификацию выданной культуры микроорганизмов по морфологическим, культуральным и биохимическим признакам.

1 занятие: приготовить мазки из выданной культуры микроорганизмов и провести их окраску по Граму, Циль-Нильсену, Михину, в «висячей капле» для определения подвижности, измерить размеры микроорганизмов и отметить их форму и взаимное расположение. Провести посев выданной культуры на чашку Петри и пробирку с МПА и МПБ для изучениях культуральных признаков.

2 занятие: изучить культуральные признаки выросших колоний.Посеять выросшую культуру на среды Гиса, МПБ с индикаторными бумажками на реакции на индол, аммиак, сероводород, МПА с желатиной для изучения биохимических признаков.

3 занятие: изучить биохимические признаки выросшей культуры и сделать вывод о принадлежности выданной культуры.

Оборудование: культура микроорганизмов, бактериологические петли, шпатели, красители, предметные стёкла, чашки Петри, пробирки. Среды: МПА, МПБ, МПЖ, среды Гиса, полоски фильтровальной бумаги, пропитанной индолом, H_2S, NH_3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Щеглова*, М.К. Руководство для большого практикума по микробиологии / М.К. Щеглова, Н.В. Глухов З.А. Остроухова. – Саратов: Изд-во Саратовского университета, 1981 – 99 с.

ТЕМА 10 САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДУХА. САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОБОРУДОВАНИЯ, ИНВЕНТАРЯ, РУК.

Цель: освоить методики бактериологического исследования воздуха и его санитарной оценки. Освоить методы санитарно-бактериологического контроля технологического оборудования, инвентаря и рук.

Воздух не является благоприятной средой для обитания микроорганизмов. Микробы попадают в воздух из почвы, с поверхности растений, из воды и др. Количество и состав микрофлоры в воздухе непостоянны. Для санитарной оценки воздуха учитывают общее количество микробов в 1 $м^3$ воздуха, а также качественный состав (наличие санитарно-показательных и патогенных микроорганизмов). Исследование проводят седиментационным (осадочным), фильтрационным и аспирационным методами.

Фильтрационный метод проводится с использованием специальных бактериоуловителей Дьяконова и мембранных фильтров и заключается в пропускании определенного объема воздуха через специальную систему-бактериоуловитель или через мембрану.

Бактериоуловитель представляет собой стерильный сосуд со стеклянными бусами и налитой в него жидкой средой (физиологический раствор, МПБ) в объеме 50-100 мл, закрытый пробкой. Через пробку пропущены две трубки: одна опущена до дна, другая - не касается жидкости и соединена резиновой трубкой с разрежающим насосом, снабженным манометром. После пропускания воздуха через данную систему содержимое сосуда взбалтывают и 1 мл жидкости вносят в чашку Петри с расплавленным и охлажденным до 45 °С МПА, выдерживают в термостате при 37 °С 48 ч, затем подсчитывают колонии. Полученное число, умножают на объем жидкой среды в сосуде, делят на количество литров пропущенного воздуха и умножают на 1000 (то есть, на количество литров воздуха в $1м^3$).

После пропускания воздуха через мембранные фильтры фильтрующие мембраны накладывают на поверхность плотной питательной среды в чашке Петри, культивируют в термостате, подсчитывают количество выросших колоний. Полученное число делят на количество литров пропущенного воздуха и умножают на 1000, то есть также вычисляют микробное число воздуха.

В настоящее время для микробиологического исследования воздуха широко применяют **аспирационный метод** с использованием аппарата Кротова (рис. 12), конструкция которого основана на принципе ударного действия воздушной струи. Прибор представляет собой цилиндрической формы металлический сосуд, внутри которого вмонтирован электромотор с центробежным вентилятором и вращающимся диском - подставкой для чашки Петри с плотной питательной средой. Корпус прибора герметически закрывается крышкой, центральная поверхность которой имеет вид диска из прозрачного плексигласа с радиально расположенной клиновидной щелью. При вращении вентилятора воздух засасывается через щель крышки, ударяется о поверхность питательной среды, вращающейся на подставке чашки Петри, и содержащиеся в струе воздуха бактерии оседают (прилипают). Имеющийся в приборе ротаметр указывает количество (объем) пропущенного воздуха. Затем чашки Петри помещают в термостат на 48 ч и далее подсчитывают количество выросших колоний и микробное число воздуха.

Седиментационный метод оседания Коха заключается в том, что чашки Петри с МПА оставляют открытыми на 5-10 минут в исследуемом помещении. Для определения этим методом санитарно-показательных микроорганизмов (гемолитических стафилококков, стрептококков) чашки Петри с кровяным агаром оставляют открытыми в течение 40 минут. Затем чашки Петри закрывают, надписывают, помещают в термостат при 37°С на 24 ч, после чего подсчитывают колонии микробов. Колонии подсчитывают под лупой (с увеличением в 2-5 раз). Каждая колония является потомством одной

бактериальной клетки, поэтому, таким образом определяют первоначальное число микробов, осевших на поверхность питательной среды в чашке Петри.

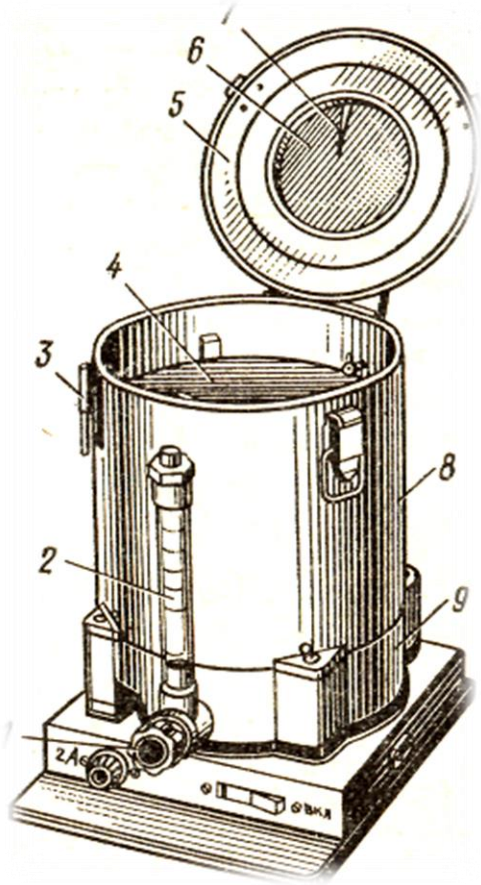

Рис. 12. Внешний вид аппарата Кротова
1 – вентиль ротаметра; 2 – ротаметр; 3 – накидные замки; 4 – вращающийся диск; 5 – крышка; 6 – диск со щелью (7); 8 – корпус; 9 – основание.

Чтобы определить количество бактерий, содержащихся в 1 $м^3$ (микробное число воздуха), используют формулу Омелянского:

$$X = (а \cdot 100 \cdot 5 / б \cdot 10 \cdot в) \cdot 1000,$$

где X — количество микробов в 1 $м^3$ (1000 л) воздуха; а — количество выросших колоний в чашках Петри; б — площадь чашки Петри ($\pi \cdot r^2$, $см^2$); в — время, в течение которого чашка Петри была открыта; 100, 5 (время, мин.) и 10 (объем воздуха, л) – показатели, установленные Омелянским. Правилом Омелянского предусматривается, что на поверхности агара в чашке Петри с площадью 100 $см^2$ за 5 минут из воздуха оседает такое количество микробов, которое находится в его 10 л.

Воздух жилых помещений считается благополучным в санитарном состоянии, если микробное число летом составляет не более 1500, а в зимний период – не более 4500. При санитарно-бактериологической оценке воздуха по наличию патогенных микроорганизмов (микобактерий туберкулеза, возбудителей пастереллеза, туляремии, бруцеллеза и др.) используют специальные (элективные) среды.

Задание: провести исследование воздуха в помещениях методом Омелянского.

Санитарно-бактериологическое исследование оборудования, инвентаря, рук.

В целях санитарного надзора объектов пищевой промышленности проводится бактериологическое обследование технологического оборудования и рук работников пищевой промышленности.

Приготовление смывов.

При взятии смывов пользуются стерильными ватными тампонами, которые перед употреблением смачивают в стерильном физиологическом растворе. Смывы делают с обеих рук, тщательно протирая ладони, межпальцевые промежутки и подногтевые пространства.

Смывы с поверхности оборудования и предметов делают с помощью трафаретов площадью 1 и 5 кв. см из нержавеющего металла. Перед взятием пробы трафарет смачиваю спиртом, поджигают и накладывают на поверхность исследуемого объекта. Смоченным стерильным ватным тампоном протирают поверхность, ограниченную трафаретом. Тампон погружают в пробирку с физиологическим раствором. Ватный тампон, которым проводили смывы с рук, помещают в пробирку с 9 мл стерильного физиологического раствора и получают разведение 1:10. Пробирку встряхивают в течение 3-5 минут.

Для определения общего количества микробов из соответствующего разведения берут 0,1 мл, помещаю в чашку Петри с МПА, и растирают шпателем. Шпатель предварительно смачивают спиртом и прожигают над пламенем горелки. Чашки с посевами ставят в термостат при температуре 37 С на 48 часов. Число выросших колоний умножают на разведение и судят о степени загрязнённости объекта.

Санитрано-гигиеническое благополучие объекта устанавливают по отсутствию кишечной палочки и фекального стрептококка.

Оборудование: чашки Петри с мясопептонным агаром, аппарат Кротова, термостат, пипетки на 1—2 мл, чашка Петри со средой Эндо, с мясопептонным агаром, пробирки с физиологическим раствором, стерильные ватные тампоны или квачи, металлический трафарет, шпатель, спирт.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Карпунина*, Л.В. Учебно-методическое пособие для выполнения лабораторных работ по дисциплине «Микробиология и иммунология» для студентов направления 111100.62 - "Зоотехния", профиль подготовки «Непродуктивное животноводство» / Л.В. Карпунина, Е.А. Горельникова. – Саратов: Изд-во ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2012.

2. Оркин, В.Ф. Методические указания и задания к выполнению лабораторных работ по микробиологии молока и молочных продуктов для студентов специальности 35100 – «Товароведение и экспертиза товаров» и 271100 – «Технология молока и молочных продуктов» / Оркин В.Ф, Зыкин Л.Ф., Хапцев З.Ю., Гришина А.В., Терехова С.И. Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ». – 2011. – 129 с.

ТЕМА 11. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНГИЕ МЯСА.

Цель: освоить методы санитарно-бактериологического контроля мяса.

В микробиологической лаборатории проводятся исследования: бактериоскопические – изучение формы, размеров, количества и других признаков, имеющихся в изучаемом материале, а также отношение к окраске; бактериологические – выделение микроорганизмов из материала путем культивирования их на питательных средах с последующей идентификацией.

Бактериологическое исследование мяса

Для оценки качества мяса имеет большое значение исследование его микрофлоры. Микробиологическое исследование мяса проводят для определения бактериальной контаминации, наличия возбудителей инфекционных заболеваний и пригодности его в пищу. Вначале проводится органолептическое исследование мяса, затем для определения бактериального загрязнения сырого мяса пользуются микроскопическим подсчетом бактерий в мазках из мяса и проводят посев на питательные среды.

Определение количества микробов в мясе методом посева

В стерильную колбу наливают 50 мл стерильной воды или физиологического раствора и добавляют 1 г размельченного в ступке мяса, интенсивно встряхивают и фильтруют через стерильный фильтр. Количество микробов в мясе устанавливают путем его посева на плотные и жидкие питательные среды. На плотных питательных средах численность микробов определяют по количеству выросших колоний, а на жидких - по наименьшему разведению, в котором появился рост.

Приготовление разведений

Стерильной пипеткой вносят 1 мл фильтрата в первую пробирку с 9 мл стерильной воды. Получают разведение 1:10. Новой стерильной пипеткой перемешивают разведение 1:10 и берут 1 мл. Его переносят во вторую пробирку с 9 мл стерильной воды. Получается разведение 1:100 и т. д. Обычно готовят разведения 1:10; 1:100; 1:1000 и 1:10000. С целью экономии пипеток одновременно по 1 мл каждого разведения вносят в бактериологические чашки, после чего в них наливают расплавленную и охлажденную до 45 °С питательную среду (около 10 мл). Исследуемый материал равномерно распределяют в питательной среде и оставляют для застывания. Затем все чашки переворачивают вверх дном и помещают в термостат при температуре 37 °С на 2-3 суток.

На чашках Петри делают надписи с указанием даты, питательной среды, разведения мяса.

Оборудование: мясо, ступка, пестик, стерильный песок, стерильная фильтровальная бумага, воронка, флакон со стерильным физиологическим раствором или дистиллированной водой, 5 пробирок с 9 мл стерильного физиологического раствора или стерильной дистиллированной водой, стерильные чашки Петри, расплавленный МПА, термостат.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Оркин,* В.Ф. Методические указания к лабораторным работам по микробиологии для студентов 270900 – «Технология мяса и мясопродуктов»/ сост. В.Ф. Оркин, Л.В. Карпунина, З.Ю. Хапцев, А.А. Щербаков. Изд-во ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2006. -104 с
2. *Сперанский,* В. В. Лабораторные методы по ветериарно-санитарной экспертизе мяса. / В.В. Сперанский, Л.Б. Лубсанова Л.Б.- Улан-Удэ: ВСТУ, 2004. – 19 с.

ТЕМА 12. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО КОЛИЧЕСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ В СЫРОМ МОЛОКЕ ПРЯМЫМИ МЕТОДАМИ

Цель: ознакомить с методами бактериологического исследования молока по определению общего количества микроорганизмов (методы посева на питательные среды и прямого микроскопического подсчета).

О санитарно-гигиеническом состоянии молока можно судить по загрязнению его механическими примесями, по количественному содержанию бактерий, характеру микрофлоры, кислотности, наличию возбудителей инфекционных заболеваний и т.д.

По этим показателям определяют пригодность молока для непосредственного потребления, переработки на молочные продукты, санитарное состояние фермы и гигиену получения молока.

Для определения содержания микроорганизмов в молоке применяют следующие прямые методы:

1. Метод посева на питательные среды.
2. Непосредственный подсчет микроорганизмов под микроскопом.

Определение общего количества бактерий в молоке методом посева

Делают посевы различных разведении молока: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000. Во все чашки добавляют по 1 мл соответствующего разведения молока и 10 мл расплавленного и охлажденного до 45-50 ºС МПА после равномерного перемешивания и застывания агара, чашки помещают в термостат.

Схема приготовления разведений молока и посевов приведена на рисунке 14.

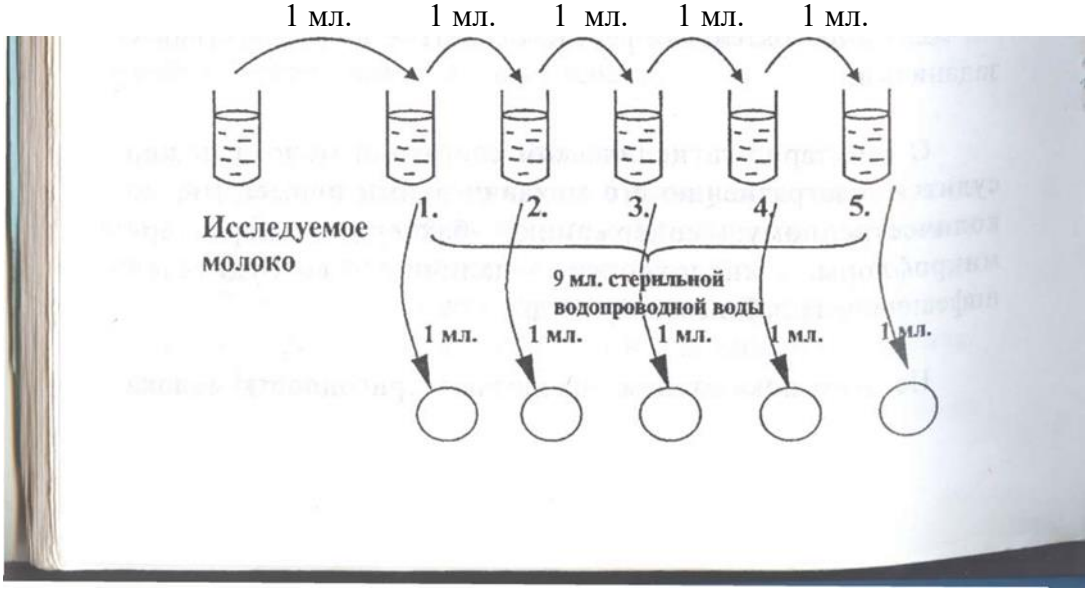

Рисунок 14. Схема приготовления разведений молока.

Непосредственный подсчет микробов в мазках из молока методом Брида:

1. На предметном стекле восковым карандашом наносят квадрат площадью 2х2 см (400 мм^2).
2. Микропипеткой в центр квадрата вносят 0,01 мл испытуемого молока и равномерно распределяют его в пределах квадрата, т.е. готовят мазок с известной площадью.
3. Мазки подсушивают на воздухе, фиксируют и обезжиривают 10-15 минут в

спирт-эфире.

4. Окрашивают 2-3 минуты водным 2% раствором метиленовой синьки, промывают мазок и высушивают фильтровальной бумагой.

5. Проводят расчет количества микробов, содержащихся в 1 миллилитре испытуемого молока:

а/ определяют сколько полей зрения придется на площадь мазка, учитывая, что площадь поля зрения иммерсионного объектива равно 0,02 мм^2. Для этого площадь мазка делят на площадь иммерсионного объектива: 400 мм^2: 0,02 мм^2. = 20000 полей зрения.

б/ сколько микроорганизмов содержится в мазке, приготовленном из молока: среднее количество бактерий, содержащихся в одном поле зрения иммерсионного объектива, умножают на количество полей зрения, укладывающихся в мазке /20000 полей зрения/,

в/ так как мазок приготовлен из 0,01 мл молока, то в 1 мл их содержится в 100 раз больше.

Культивирование ведут при температуре 37 °С 24-48 часов. Затем подсчитывают общее количество колоний. Для подсчета общего количества бактерий в 1 мл, общее количество колоний выросших в бактериологической чашке умножают на соответствующее разведение.

Оборудование: стерильные пипетки на 1-2 мл, пробирки со стерильной водопроводной водой (по 9 мл), стерильные бактериологические чашки, восковые карандаши, предметные стекла, кюветы со спирт-эфиром для фиксации мазков, пробы молока (свежего и длительного хранения), биологические микроскопы, микропипетки, водный раствор 2% метиленовой синьки, предметные стекла, пробирки со стерильным МПА (по 10 мл) с температурой. 45-50 °С.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Оркин,* В.Ф. Методические указания и задания к выполнению лабораторных работ по микробиологии молока и молочных продуктов для студентов специальности 35100 – «Товароведение и экспертиза товаров» и 271100 – «Технология молока и молочных продуктов» / Оркин В.Ф, Зыкин Л.Ф., Хапцев З.Ю., Гришина А.В., Терехова С.И. Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ». – 2011. – 129 с.

ТЕМА 13. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ.

Цель: ознакомиться с методикой бактериологического исследования простокваши, сметаны, творога и кефир, йогурта, ацидофильной простокваши, варенца, ряженки

Кисломолочные продукты вырабатываются из молока или сливок в результате молочнокислого брожения и могут быть разделены на две группы:

- продукты, приготовленные на закваскаx мезофильных молочнокислых бактерий оптимальной температурой развития около 30 °С.
- продукты, приготовленные на закваскаx термофильных молочнокислых бактерии с оптимальной температурой

развития около 40 °С.

К кисломолочным продуктам, приготовляемым на закваскаx мезофильных молочнокислых бактерий относятся: простокваша обыкновенная, творог, сметана, кефир.

1. Простокваша обыкновенная.

В молоко, пастеризованное при 85-90 °С в течение 10- 15 мин. и охлажденное до 30 °С, вносят 5% закваски, содержащие чистые культуры мезофильных молочнокислых стрептококков (*Str. lactis, Str. cremoris*) и ароматообразующие бактерии *(Str. cremoris, Str. diacetilactis, Str. paracitrovorus*). Сквашивание молока происходит через 6-8 ч. После образования сгустка простоквашу (кислотность не ниже 75 °Т) направляют в помещение с температурой, близкой к 0 °С, но не выше 8 °С, для набухания белков. Готовая простокваша имеет ровный сгусток слабокислый вкус (кислотность 75~120 °Т). Готовую продукцию ежедневно контролируют на наличие бактерий группы кишечной палочки и по микроскопическому препарату. Для микроскопического исследования бактериальной петлей делают мазок из простокваши, высушивают на воздухе, фиксируют и обезжиривают в спирт- эфире 10-15 мин. Затем окрашивают 1% водным раствором метиленовой синьки 2-3 минуты.

В продукте хорошего качества обнаруживают клетки молочнокислых стрептококков. При нарушении технологического процесса или при длительном хранении встречаются: дрожжи, кишечная палочка, белая молочная плесень, развивающиеся главным образом на поверхности продукта.

2. Творог.

Вырабатывается из молока, пастеризованного при 78- 80 °С с выдержкой 20-30 сек. Для выработки творога применяют закваска состоящую из мезофильных молочнокислых стрептококков: *Str. lactis, Str.cremoris, Str. acetoinicus.*

В целях ускорения процесса сквашивания до 4-4,5 ч, вместо 6-7 ч используют комбинированную закваску, состоящую из мезофильных молочнокислых стрептококков и термофильного стрептококка в равных количествах 1:1.

При производстве творога наряду с бактериями, вносимым с закваской, развиваются также микроорганизмы, остающиеся после пастеризации молока. Особенно нежелательно развитие термоустойчивых молочнокислых палочек. Количество их может увеличиваться в твороге до 1 млн. и даже сотен млн. в 1 г. В результате этого кислотность продукта нарастает значительно интенсивнее, чем при развитии только молочнокислых стрептококков, и качество его снижается.

Основными условиями, приводящими к интенсивному развитию в твороге термоустойчивых палочек, являются повышенная температура, длительный процесс самопрессования, недостаточное охлаждение готового продукта.

Микробиологический контроль проводят по бродильной пробе и микроскопическому исследованию мазков. В поле зрения препарата, должны находиться стрептококки. При

нарушении технологии и условий хранения могут встречаться посторонние микроорганизмы: дрожжи, плесневые грибы, которые портят продукт.

3. Сметана.

После заквашивания микрофлора сливок состоит из микроорганизмов, внесенных с закваской, остаточной микрофлоры пастеризованных сливок и микроорганизмов, попавших с оборудования.

Поскольку сливки пастеризуют при 85-95 °С в остаточной микрофлоре преобладают термоустойчивые молочнокислые палочки и споры бацилл. В результате технологической обработки сливки могут дополнительно обсеменяться молочнокислыми стрептококками и палочками. В конце сквашивания, продолжительность которого 13-16 ч, кислотность сметаны достигает 62-68 °Т, а количество молочнокислых стрептококков 2,5-25 млн./мл. При длительном хранения могут разливаться дрожжи, сбраживающие молочный сахар, наблюдается сильное газообразование и ощутимый спиртовой запах. Плесени разлагают жир и вызывают прогорклый вкус.

Микробиологический контроль готового продукта включает постановку бродильной пробы и микроскопическое исследование. В мазках из готового продукта хорошего качества доминируют стрептококки. При нарушение технологических процессов могут встречаться дрожжи, плесневые грибы.

4. Кефир.

Это продукт смешанного брожения: молочнокислого и спиртового. Молочнокислое брожение вызывается молочнокислыми стрептококками и палочками, спиртовое - дрожжами. Для приготовления кефира молоко пастеризуют при 90-92 °С с выдержкой 2-3 мин охлаждают до 20-25 °С. Для заквашивания молока применяют грибковую или производственную кефирную закваску (2-5 %) или закваску из чистых культур микроорганизмов, которую вносят в количестве 5-10% от объема сквашиваемого молока. Сквашивание длится 8-12 ч до образования сгустка кислотностью 85-100 ^{o}Т. По окончании сквашивания кефир перемешивают и охлаждают до температуры созревания 14- 16 °С. Продолжительность созревания кефира с момента, заквашивания не менее 24 ч. В зависимости от кислотности и содержания спирта различают кефир слабый, средний и крепкий.

В кефирных грибках содержатся молочнокислые палочки, различные виды дрожжей, стрептококки и уксуснокислые бактерии. В процессе приготовления кефир может загрязняться посторонней микрофлорой, что вызывает пороки продукта.

При определении качества готового продукта:

1) проводят микроскопическое исследование мазков из кефира, окрашенных водным раствором метиленовой синьки.

2) определяют бродильный титр.

В мазках из доброкачественного кефира обнаруживают молочнокислые стрептококки, палочки, дрожжи. Молочнокислые стрептококки преобладают над палочками: они составляют 94-95%, палочки - 4-6%, дрожжи - 1% всей микрофлоры. Титр кишечной палочки не менее 0,3.

К кисломолочным продуктам, приготовленным с применением чистых культур термофильных молочнокислых бактерий относят йогурт, ложная простокваша, мацун, мацони, ряженка, варенец напитки «Южный» и «Снежок», ацидофильное молоко и ацидофильную простоквашу. Для их приготовления используют смесь *Str. thermophus* и *L.bulgaricus.*

Их готовят из молока, пастеризованного при 85-90 °С. При заквашивании молока 5% закваски, из смеси термофильного стрептококка и болгарской палочки, свертывание

наступает рез 2,5-3 ч, при температуре сквашивания 40-42 °С. Кислотность готового продукта должна быть 80-90 °Т.

Для микроскопии из йогурта делают мазок, который высушивают, фиксируют в спирт-эфире и окрашивают раствором метиленовой синьки. В мазках должна находиться специфическая микрофлора. Количество клеток болгарской палочки в два раза меньше, чем термофильного стрептококка.

Ацидофильная простокваша готовится также, в состав за кваски входят *Str. thermophilus и L.acidophilus.* Ацидофильное молоко отличается от простокваши тем, что микрофлора состоит только из *L. acidophilus.*

В закваскаx для ряженки и варенца преобладает термофильный молочнокислый стрептококк.

Состав микрофлоры напитка. «Снежок» сходен с микрофлорой йогурта. Для его приготовления в молоко вносят 7% сахара, пастеризуют при 85-90°0, заквашивают при 42-45°С термофильным стрептококком и болгарской палочкой. Сквашивание молока обычно продолжается не более 2,5-3 ч. Затем добавляют фруктовой сироп.

Оборудование: пробы сметаны, кефира, простокваши и творога; йогурта, ацидофильной простокваши, варенца, ряженки, пробирки со стерильной водопроводной водой по 9 мл, стерильные градуированные пипетки на 1 и 2 мл, бактериологические петли, предметные стекла, термостат, 1% - й водный раствор метиленовой синьки, среда Кесслера в пробирках, смесь Никифорова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Оркин,* В.Ф. Методические указания и задания к выполнению лабораторных работ по микробиологии молока и молочных продуктов для студентов специальности 35100 – «Товароведение и экспертиза товаров» и 271100 – «Технология молока и молочных продуктов» / Оркин В.Ф, Зыкин Л.Ф., Хапцев З.Ю., Гришина А.В., Терехова С.И. Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ». – 2011. – 129 с.

ТЕМА 14. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛБАСНЫХ ИЗДЕЛИЙ. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОНСЕРВОВ.

Цель: освоить методы бактериологического исследования колбасных изделий. Освоить методы бактериологического исследования консервов.

Отбор и подготовка проб к анализу

Отбирают точечные пробы в соответствии с ГОСТ 9792- 73, ГОСТ Р 51447-99 и по общепринятым методам по ГОСТ 26668-85. Особое внимание должно быть уделено обеспечению стерильности посуды, инструментов, материалов, которые соприкасаются с продуктом во время отбора проб. Стерилизацию осуществляют насыщенным паром в течение 30 мин в автоклаве при 121 °С или горячим воздухом в стерилизаторе: с принудительной циркуляцией воздуха при температуре от 170° С в течение 60 мин; без принудительной циркуляции воздуха при температуре 180-185 °С в течение 15 мин и при 160-165 °С в течение 120 мин. Допускается обрабатывать инструменты погружением в этанол с последующим фламбированием.

Пробы продуктов для микробиологического исследования отбирают раньше проб для физико-химического и органолептического анализа асептическим способом, с помощью стерильных инструментов, исключающим микробное загрязнение продукта из окружающей среды, в стерильную посуду, горло которой предварительно обжигают в пламени горелки. Нормативно-технической документацией на конкретный вид продукции установлена масса (объем) пробы, достаточная для проведения полного микробиологического анализа. От продукции в транспортной или потребительской таре, масса (объем) которой больше массы (объема) пробы, а также от неупакованной продукции отбирают точечные пробы из разных мест и с различной глубины, а также с поверхностных слоев, соприкасающихся с тарой.

Если масса (объем) пробы продукта не установлена в нормативно-технической документации на конкретный вид продукции, то от каждой попавшей в выборку упаковочной единицы продукции в потребительской таре отбирают не меньше 1 шт., продукции в транспортной таре - до 1000 г (1000 см). От кусковой продукции массой нетто до 1000 г отбирают точечные пробы ложкой, пинцетом или другим инструментом в зависимости от вида и размера кусков и помещают в посуду или упаковывают в фольгу. От кусковой продукции массой нетто более 1000 г пробы отбирают одним из следующих методов:

- отрезают или вырезают часть продукта ножом, пилой или другим инструментом (у изделий квадратной формы разрез делают перпендикулярно к грани, продольной формы - перпендикулярно к продольной оси, шарообразных изделий - клинообразно;
- продукт в нескольких местах режут ножом и с поверхности разреза и из глубины продукта скальпелем берут необходимое количество кусков, которые пинцетом переносят в посуду с широким горлом;
- поверхностный слой продукта толщиной от 0,5 до 1 см срезают ножом или проволокой; из глубоких слоев берут при помощи пробоотборника (буравчика или зонда) и выдавливают продукт в посуду с широким горлом до тех пор, пока не отберут необходимое количество. При отборе пробы из глубины продукта его просверливают в разных местах не менее чем до половины высоты;
- от твердого продукта пробы отбирают при помощи долота или другого инструмента.

Каждую отобранную пробу маркируют этикетками с указанием наименования продукта, предприятия-изготовителя, номера партии, даты отбора проб, цели микробиологического анализа, подписи лиц, отбиравших пробу. Пробы, предназначенные для исследования вне предприятия-изготовителя, пломбируют, опечатывают печатью организации, отвечающей за контролируемую продукцию, и транспортируют в лабораторию. Пробы замороженных продуктов укладывают в изотермическую тару (термос, изотермическая коробка), или обкладывают сухим льдом, или упаковывают другим способом, обеспечивающим сохранение при температуре, не превышающей -15 °С. Пробы скоропортящихся продуктов транспортируют при температуре 5 °С не более 6 ч.

В зависимости от вида продукта объединенную пробу массой 50 г составляют из точечных проб следующим образом.

Колбасные изделия в оболочке, продукты из свинины, баранины и говядины помещают в металлический или эмалированный тазик (тарелку), тщательно протирают ватным тампоном, смоченным спиртом, и дважды обжигают над пламенем спиртовой горелки. Затем батоны разрезают продольно стерильным (фламбированным) ножом или скальпелем на две половинки, не рассекая оболочку противоположной стороны батона. Пробу отбирают из нескольких участков центральной части батона и из-под оболочки обеих его половинок.

Из свиных, бараньих, говяжьих продуктов на костях и из бекона пробы вырезают стерильным инструментом из различных участков обожженного образца на глубине 2-3 см от поверхности, предпочтительно ближе к кости.

Изделия без оболочки (мясные хлебы, паштеты, студни и др.) исследуют с поверхности и в глубине. Для этого после развертывания упаковки с каждого из исследуемых образцов делают смыв новым стерильным увлажненным ватным тампоном с тех участков продукта, с которыми могли соприкасаться руки упаковщика. Тампоны помещают в пробирки, заполненные на 3/4 одной из сред: ХБ, Хейфеца или Кесслер. Для анализа глубинных участков продукта образцы помещают в металлический или эмалированный тазик (тарелку), смачивают спиртом и обжигают. Затем делают продольный разрез и отбирают навеску методом, указанным для колбасных изделий и продуктов в оболочке. Составляют одну объединенную пробу для каждого образца в отдельности и помещают ее в предварительно взвешенную стерильную бюксу или чашку Петри.

Из объединенной пробы каждого образца берут в стерильную посуду (пергамент) навеску массой 20 ± 0,1 г, которую помещают в стерильную колбу (стакан) гомогенизатора, добавляют 4-кратное количество стерильного физиологического раствора и гомогенизируют в электрическом смесителе. Вначале материал измельчают на кусочки при замедленной частоте вращения ножей, затем при 15000-20000 об/мин в течение 2,5 мин.

При отсутствии гомогенизатора допускается приготовление испытуемой взвеси в ступке. 20 г продукта растирают в стерильной фарфоровой ступке с 2-3 г стерильного песка, постепенно приливая 80 $см^3$ стерильного физиологического раствора (или 0,1 % раствора стерильной пептонной воды). При растирании проб вареных изделий мажущейся консистенции (ливерные, кровяные колбасы) стерильный песок можно не добавлять. Взвесь 15 мин выдерживают при комнатной температуре и отбирают для посевов на питательные среды стерильной градуированной пипеткой. В 1 $см^3$ приготовленной взвеси содержится 0,2 г продукта.

Отбор и подготовка проб к анализу консервов

Отбор проб проводят в соответствии с требованиями ГОСТ 26668-85 и ГОСТ 51446-99. Вначале визуально определяют внешний вид упаковочных единиц, попавших в выборку, и подразделяют их на следующие:

- нормальные по внешнему виду, при осмотре которых не обнаружены отклонения, вызванные развитием микроорганизмов;
- подозрительные по внешнему виду, при осмотре которых обнаружено одно или несколько отклонений, которые могли возникнуть вследствие как микробной порчи, так и химических и биохимических процессов в продукте;
- испорченные продукты, при осмотре которых обнаружены явные дефекты упаковочных единиц или продукта - бомбаж, хлопуша, брожение, плесневение, гниение, ослизнение, прокисание и др.

Отбор проб проводят по каждому виду продукции отдельно. От консервов, расфасованных в тару вместимостью до 1 $дм^3$, отбирают 3 упаковочные единицы, вместимостью более 1 дм' - 1 единицу. Если масса (объем) пробы продукта не установлена в нормативно-технической документации на конкретный вид продукции в потребительской таре, то от каждой упаковочной единицы (коробка, ящик), попавшей в выборку, отбирают не менее одной банки.

Отобранные пробы, предназначенные для анализа вне предприятия-изготовителя, транспортируют в соответствии с условиями, установленными нормативно-технической документацией. Вначале консервы осматривают, чтобы определить наличие дефектов, устанавливают соответствие надписи на литографическом оттиске или этикетке указанной в сопроводительном документе и проверяют герметичность тары. Для этого банки укладывают в сосуд с нагретой до кипения водой (но не ниже 80° С) на 5 мин при высоте слоя воды над банками не менее 5 см. Над поверхностью разгерметизированных банок появляются пузырьки воздуха. Герметичность полимерной тары с консервами, укупоренной крышками с упругой мембраной (кнопкой), определяют визуально; поверхность мембраны должна быть вогнута.

Перед началом исследования герметично укупоренную, но загрязненную тару (стеклянную, металлическую, полимерную) моют водой с детергентом, ополаскивают чистой водой и высушивают. Консервы непосредственно перед микробиологическим анализом в соответствии с ГОСТ 26669-85 выдерживают (термостатируют) в течение определенного срока при температуре, благоприятной для развития микроорганизмов в продукте. Термостатированию подлежат консервы:

- герметично укупоренные, без дефектов по внешнему виду, предназначенные для определения промышленной стерильности консервированного продукта и микробиологической стабильности консервов;
- с вибрирующими концами и хлопушами в герметично укупоренной таре, предназначенные для выявления причин возникновения этих дефектов.

Консервы, предназначенные для выявления ботулинических токсинов, бомбажные, с признаками микробиологической порчи и негерметичные термостатированию не подлежат.

Для проявления жизнедеятельности мезофильных аэробных, факультативно-анаэробных и анаэробных микроорганизмов консервы термостатируют при 30-37 °С. В таре вместимостью до 1 $дм^3$ включительно инкубацию осуществляют не менее 5 суток, вместимостью более 1 $дм^3$ - не менее 7 суток.

Для проявления жизнедеятельности термофильных аэробных, факультативно-анаэробных и анаэробных микроорганизмов консервы в таре любой вместимости термостатируют при 55-62 °С как минимум 3 суток. В период термостатирования консервы ежедневно осматривают и при обнаружении проявившихся дефектов тары сразу удаляют из термостата и выдерживают 24 ч при комнатной температуре.

Консервы в таре, принимающей после охлаждения при комнатной температуре нормальный внешний вид, считают бездефектными и продолжают их термостатирование. После термостатирования консервов и охлаждения в течение 24 ч до комнатной температуры отмечают состояние тары и, если возможно, внешний вид продукта.

Основные показания для бактериологического исследования полных консервов:

- изготовление на экспорт;
- закладка на длительное хранение;
- для детского питания;
- отсутствие нормативной документации на показатели МАФАнМ сырья и полуфабрикатов перед стерилизацией;
- обнаружение в консервах перед стерилизацией повышенного содержания МАФАнМ или присутствия спор анаэробных микроорганизмов;
- нарушения, допущенные в технологическом процессе, которые отрицательно влияют на качество продукта.

В соответствии с требованиями научно-технической документации микробиологическое исследование проводится:

- на стерильность;
- на промышленную стерильность;
- на возбудителей порчи;
- на присутствие патогенных и токсигенных микроорганизмов.

Стерильность консервов определяют в случаях, когда они выработаны по специальным заказам и для поставок экспедициям, космонавтике, лечебным учреждениям.

Консервы, подготовленные для микробиологических анализов, обрабатывают в специально оборудованном для этих целей боксе, где исключено движение воздуха, создаваемое сквозняками. Стены, пол и потолок должны быть облицованы материалом, устойчивым к влажной обработке дезинфицирующими веществами, или выкрашены краской. Для стерилизации воздуха бокс

оборудуется ультрафиолетовыми лампами из расчета 1,5 - 2,5 Вт на 1 $м^3$ бокса. Бокс моют и дезинфицируют непосредственно перед проведением анализа (не ранее чем за 24 ч до начала) и по его окончании. Все поверхности протирают хлорными или другими дезинфицирующими препаратами по соответствующей для каждого препарата инструкции. За 45 мин до начала работы в боксе на 30 ± 5 мин включают бактерицидные лампы.

В настоящее время для проведения микробиологических анализов используют ламинарные боксы (защитные кабины сверхчистого воздуха) Ужгородского завода медицинского оборудования «Ламинар» или марки ВРМ 1200 (Венгрия). В нем размещают стол, табурет и предметы, которые нужны для проведения анализа консервов. На столе должны быть: спиртовка или газовая горелка; банка с притертой пробкой со спиртом; закрытая крышкой банка с предварительно заготовленными плотными стерильными ватными тампонами размером 3 х 3 см или ватными кольцами; банки с дезинфицирующим раствором (высота слоя 3 см) для отработанных после анализа пипеток или трубок; небольшой металлический или эмалированный поднос, на который ставят анализируемые банки; стерильные пипетки или трубки, с помощью которых отбирают пробу. В выдвижном ящике стола должен храниться вспомогательный инвентарь: пинцет и пробойник в форме копья с поперечным сечением в виде ромба или равнобедренного треугольника. При работе с большим числом банок используют пробойник, укрепленный на штативе. В этом случае вскрытие производят путем нажима пробойником на крышку банки при помощи рычага. Перед вскрытием каждой банки пробойник фламбируют в пламени горящего спиртового тампона.

В боксе должен находиться только микробиолог, проводящий анализ, и при необходимости помощник.

Поверхность нормальных по внешнему виду консервных банок перед вскрытием обрабатывают этиловым спиртом. У стеклянных банок обрабатывают крышку, у металлических — конец, противоположный маркированному. Поверхность крышки протирают спиртовым тампоном, который оставляют на поверхности и перед вскрытием консервов поджигают. Резиновые колпачки и корончатые крышки, бекелитовые и пластмассовые затворы обрабатывают таким же образом, но тампон не поджигают. Металлическую крышку (конец) в зависимости от целей анализа вскрывают или прокалывают пробойником 1-4 раза в непосредственной близости от горящего тампона. Размер отверстия (диаметр или длина) должен составлять 1-3 см.

Дефектные по внешнему виду консервы помещают на металлический лоток. Непосредственно перед отбором навески продукта поверхность крышки (конца) обрабатывают указанным выше способом, но тампон не поджигают. Обработанную крышку накрывают перевернутой стерильной металлической воронкой так, чтобы она полностью закрыла поверхность. Через узкое отверстие воронки осторожно прокалывают крышку (конец) стерильным пробойником, получая игольное отверстие. Вместо металлической воронки допускается применять полиэтиленовый пакет. После обработки крышки консервы помещают в предварительно протертый этиловым спиртом полиэтиленовый пакет, дно которого должно плотно прилегать к вскрываемой поверхности. Снизу пакет завязывают. Осторожно, легким нажимом пробойника делают отверстие одновременно в крышке консервной банки и прижатом к ней полиэтиленовом пакете. После того как из банки перестанет выходить содержимое (газ и продукт), воронку и пакет убирают, крышку еще раз протирают стерильным тампоном, отверстие расширяют.

Из каждой пробы продуктов в зависимости от определяемых показателей отбирают одну или несколько навесок, т. е. часть пробы необходимой массы (объема), предназначенную для приготовления гомогената, исходного разведения или непосредственного высева в питательные среды. Навеску для посева отбирают весовым или объемным методом после вскрытия банки консервов в условиях, исключающих микробное загрязнение. В образце должны быть представлены все компоненты и в том же соотношении, что и в продукте. В подозрительных консервах (при наличии кольца на границе продукта с тарой или осадка на дне банки) навески отбирают без предварительного перемешивания продукта так, чтобы в навеску попала часть осадка или кольца. При ограниченном числе упаковочных единиц допускается отбирать навески консервов из упаковок, прошедших термостатирование при 30-37 °С, для выявления не только мезофильных, но и термофильных микроорганизмов.

Оборудование: колбасные изделия, ступка, пестик, стерильный песок, стерильная фильтровальная бумага, флакон со стерильным физиологическим раствором или

дистиллированной водой, стерильные чашки Петри, расплавленный МПА, термостат, консервы, пробойник, пипетка, пробирка с МПБ и со средой Китт-Тароцци для выращивания анаэробных микроорганизмов, термостат.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Оркин,* В.Ф. Методические указания к лабораторным работам по микробиологии для студентов 270900 – «Технология мяса и мясопродуктов»/ сост. В.Ф. Оркин, Л.В. Карпунина, З.Ю. Хапцев, А.А. Щербаков. Изд-во ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2006. -104 с

ТЕМА 15. ИЗУЧЕНИЕ ЭПИФИТНОЙ МИКРОФЛОРЫ ЗЕРНА.

Цель работы: **приобретение навыков выявления эпифитных микроорганизмов.**

Общие сведения

На поверхности зерна обитают разнообразные микроорганизмы. Часть из них попадает туда из ризосферы, часть заносится с пылью и насекомыми. Однако на зерне, как и на прочей поверхности растений, развиваются лишь отдельные виды микроорганизмов, называемые эпифитами. Эпифитные микроорганизмы, размножающиеся на поверхности стеблей, листьев и семян растений, получили название микроорганизмов филлосферы.

Эпифиты питаются продуктами экзосмоса растений; устойчивы к высоким концентрациям фитонцидов, выдерживают периодические колебания влажности.

Численность этих микроорганизмов невелика, и видовой состав их довольно постоянен: более 90 % составляют гнилостные бактерии, в основном неспороносные бактерии (род *Pseudomonas*). Особенно часто на зерне встречается *P. herbicola* (*Erwinia herbicola*),образующая на плотных средах золотисто-желтые колонии. Встречаются также *P. fluorescens*, микрококки, молочнокислые бактерии, дрожжи. Бацилл и микроскопических грибов немного.

В определенных условиях эпифитные микроорганизмы могут быть и полезны для растений, так как препятствуют проникновению паразитов в ткани растения. На хранении зерна присутствие эпифитных микроорганизмов может сказываться отрицательно.

На развитие микроорганизмов на зерне, а, следовательно, на сохранность последнего решающее влияние оказывают: влажность, температура, степень аэрации, целостность зерна и состояние его покровных тканей. В зрелом зерне вода находится в связанном состоянии и недоступна микроорганизмам, которые в этом случае находятся в состоянии анабиоза (покоя).

На зерне с повышенной влажностью микроорганизмы размножаются и тем быстрее, чем выше температура. Развитие микробиологических процессов на хранящемся зерне с повышенной влажностью приводит к заметному, а иногда и очень значительному повышению температуры. Это явление получило название "термогенез".

Самосогревание зерна ведет к смене микрофлоры. Свойственная зерну эпифитная микрофлора исчезает. Начинают обильно размножаться непигментированные неспороносные палочки, вытесняющие *Erwinia herbicola*.Позднее появляются термостойкие (термотолерантные) микрококки, на плотных средах чаще всего образующие мелкие белые плоские колонии, а также плесневые грибы, актиномицеты. Самосогревание свыше 40...50°С способствует развитию спорообразующих и термофильных бактерий. По мере самосогревания изменяется видовой состав и плесневых грибов.

Виды *Penicillium*, преобладающие вначале, заменяются представителями рода *Aspergillus*.

Таким образом, по видовому составу микрофлоры можно судить не только о том, подвергалось ли зерно самосогреванию, но и насколько далеко зашел этот процесс. Преобладание *Envinia herbicola* в микробном ценозе зерна служит показателем его хороших качеств. Большое количество спорообразующих бактерий и грибов указывает на потерю семенами всхожести.

Кроме порчи самого зерна благоприятные условия для развития на его поверхности микроорганизмов приводят к накапливанию выделяемых ими токсинов. При скармливании такого зерна скоту и домашней птице возникают отравления. Таким образом, правильное хранение зерна сводится к тому, чтобы не допускать развития на нем микроорганизмов.

Практическая часть

Приборы, реактивы, посуда: зерно в колбах - свежее и хранившееся в условиях повышенной влажности, весы, часовые стекла, колбы со стерильной водой (по 90 мл), колбы со стерильной водой (по 50 мл) и песком, стерильные пипетки Мора на 10 и 1 мл, стерильные чашки Петри, МПА в пробирках и колбах, водяная баня, микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

Методика выполнения работы

Количественный учет микроорганизмов на зерне. Навеску массой 5 г поместить в колбу с 50 мл стерильной водопроводной воды и 2...3 г песка. Колбу взбалтать круговыми вращательными движениями 10 мин. Из полученной вытяжки приготовить разведения (10^{-2} ; 10^{-3};10^{-4}). Отдельными стерильными пипетками Мора взять по 10 мл суспензии и перенести в колбы, содержащие по 90 мл стерильной водопроводной воды. Затем из каждой колбы взять по 1 мл суспензии соответствующего разведения в стерильные чашки Петри в двух повторностях. В каждую чашку Петри вылить по одной пробирке расплавленного, но предварительно охлажденного до 50 °С МПА.

Чашки инкубировть при 30° С. Наряду с МПА используют элективные среды .

Через три-пять дней инкубации подсчитать общее число колоний, выросших на МПА в чашках, и рассчитать количество микроорганизмов на 1 г зерна.

Определение качественного состава микрофлоры зерна. Колонии сгруппировать по культуральным признакам. Из каждой группы колоний приготовить препараты, выявить принадлежность микроорганизмов к роду или семейству и определить численность бактерий каждой группы в процентах общего числа микроорганизмов.

На основании микробиологического анализа сделать заключение о качестве зерна. На свежем доброкачественном зерне преобладает *Erwinia herbicola*(до 80 %), образующая блестящие оранжевые колонии. Встречается *Pseudomonas fluorescen*s,формирующая желтовато-зеленоватые флуоресцирующие колонии; непигментированные неспорообразующие палочки; дрожжи - блестящие, выпуклые, часто окрашенные в розовые тона колонии. При учете на сусло-агаре с мелом выявляются молочнокислые бактерии, образующие чечевицеобразные мелкие колонии с зонами растворения мела.

На несвежем зерне, хранившемся при повышенной влажности, *Erwinia herbicola, Pseudomonas fluorescens* не выявляются. Обнаруживаются микрококки, образующие мелкие белые блестящие плоские колонии; спорообразующие палочки; актиномицеты, а также неспороносные палочки. При учете на сусло-агаре выявляется значительное количество грибов, главным образом относящихся к роду *Penicillium*,а также *Aspergillus*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Донченко* Л.В., Безопасность пищевой продукции / Л.В. Донченко, В.Д. Надыкта. - СПб.: ГИОРД, 2002.-498 с.

ТЕМА 16. ОПРЕДЕЛЕНИЕ В МУКЕ И КРУПАХ ВОЗБУДИТЕЛЯ «КАРТОФЕЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ» ХЛЕБА.

СанПиН микробиологические показатели предусмотрены только для пшеничной муки. В ней определяется наличие возбудителя «картофельной болезни» хлеба. Возбудителем данного вида порчи хлеба является «картофельная палочка» – *Bacillus mesentericus.* Это крупная, неподвижная, грамположительная палочка, образующая споры. Споры термоустойчивы и сохраняются при выпечке хлеба, т. к. температура хлебного мякиша на данной стадии производства не превышает 95 ºС. «Картофельная болезнь» хлеба характеризуется появлением в мякише слизистых коричневых очагов со сладковато-хмелевым запахом. Возникает при хранении хлеба в температурных условиях выше 20 ºС. Обсеменён-ность хлеба «картофельной палочкой» зависит от количества спор в муке. В муке высшего сорта, которую получают из центральной части зёрен, спор обычно мало. В муку споры попадают из почвы.

Ход работы:

Провести количественный учёт «картофельной палочки» в муке (см. прил. 3).

Для этого на электрических весах стерильно отмерить 1 г муки и растереть в керамической ступке с 9 мл стерильного физиологического раствора (разведение муки 1:10). Затем приготовить два последовательных десятикратных разведения полученной взвеси муки в пробирках с 9 мл физиологического раствора (разведения муки 1:100 и 1:1000), используя для разведения дозатор объёмом 1 мл. Из ступки и пробирок перенести по 1 мл содержимого в пробирки с МПБ. Перенос начать с большего разведения без смены наконечника. Подписать пробирки с посевами и инкубировать при 37 ºС 1 – 2 суток.

Наблюдать появление характерного для «картофельной палочки» роста: бульон прозрачный, на его поверхности морщинистая плёнка, на дне небольшой осадок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Золотухин, С.Н., Васильев Д.А. Методические указания к проведению лабораторно-практических занятий по Санитарной микробиологии для студентов факультета ветеринарной медицины (специальность 310800 – ветеринария) специализация – ветеринарный врач-бактериолог / С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев. Ульяновск, 2000. – с. 29.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Золотухин,* С.Н., Васильев Д.А. Методические указания к проведению лабораторно-практических занятий по Санитарной микробиологии для студентов факультета ветеринарной медицины (специальность 310800 – ветеринария) специализация – ветеринарный врач-бактериолог / С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев. Ульяновск, 2000. – с. 29.
2. *Зюзина*, О.В. Общая биология: Лабораторные работы / О.В. Зюзина, О.О. Иванов, О.Б. Шуняева. – Тамбов: Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2004. – 24
3. *Донченко* Л.В., Безопасность пищевой продукции / Л.В. Донченко, В.Д. Надыкта. - СПб.: ГИОРД, 2002.-498 с.
4. *Карпунина, Л.В.* Учебно-методическое пособие для выполнения лабораторных работ по дисциплине «Микробиология и иммунология» для студентов направления 111100.62 - "Зоотехния", профиль подготовки «Непродуктивное животноводство» / Л.В. Карпунина, Е.А. Горельникова. – Саратов: Изд-во ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», - 2012. – 66 с.
5. *Карпунина,* Л.В. Микробиология. Руководство к лабораторным занятиям для студентов специальности “Биоэкология” / Л.В. Карпунина, Е.С. Мухачева. Саратов: Саратовский ГАУ, 2005. – 100 с.
6. *Кузнецова*, Е.А. Учебно-методическое пособие предназначено для самостоятельной подготовки и выполнения лабораторных работ по курсу «Микробиология» студентами специальностей 270300 «Технология хлеба, кондитерских и макаронных изделий» / Е.А. Кузнецова. Орёл: ОрёлГТУ, 2005. – 188 с.
7. *Оркин, В.Ф.* Методические указания и задания к выполнению лабораторных работ по микробиологии молока и молочных продуктов для студентов специальности 35100 – «Товароведение и экспертиза товаров» и 271100 – «Технология молока и молочных продуктов» / Оркин В.Ф, Зыкин Л.Ф., Хапцев З.Ю., Гришина А.В., Терехова С.И. Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ». – 2011. – 129 с.
8. *Оркин,* В.Ф. Методические указания к лабораторным работам по микробиологии для студентов 270900 – «Технология мяса и мясопродуктов»/ сост. В.Ф. Оркин, Л.В. Карпунина, З.Ю. Хапцев, А.А. Щербаков. Изд-во ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2006. -104 с
9. *Сперанский*, В. В. Лабораторные методы по ветериарно-санитарной экспертизе мяса. / В.В. Сперанский, Л.Б. Лубсанова Л.Б.- Улан-Удэ: ВСТУ, 2004. – 19 с.
10. *Щеглова*, М.К. Руководство для большого практикума по микробиологии / М.К. Щеглова, Н.В. Глухов З.А. Остроухова. – Саратов: Изд-во Саратовского университета, 1981 – 99 с.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение 3
Тема 1. Правила работы в микробиологической лаборатории. Микроскопия. Морфология бактерий. 4
Тема 2. Техника приготовления бактериального препарата. Простое окрашивание. 9
Тема 3. Сложное окрашивание. Окраска по методу Грама. 12
Тема 4. Сложное окрашивание. Окрашивание спор по методу Циль-Нильсона. 14
Тема 5. Морфология плесневых грибов и дрожжей 15
Тема 6. Питательные среды для культивирования микроорганизмов. Методы стерилизации. 21
Тема 7. Методы посева и культивирования анаэробных микроорганизмов. 25
Тема 8. Методы выделение чистой культуры аэробных бактерий. Методы выделения чистой культуры аэробных бактерий. 27
Тема 9 Идентификация микроорганизмов по морфологическим, культуральным и биохимическим признакам. 30
Тема 10 Санитарно-бактериологическое исследование воздуха, оборудования, инвентаря, рук. 32
Тема 11 Бактериологическое исследование мяса. 35
Тема 12 Определение общего количества микроорганизмов в сыром молоке прямыми методами 36
Тема 13 Бактериологический контроль кисломолочных продуктов 38
Тема 14 Бактериологическое исследование колбасных изделий. Бактериологическое исследование консервов.. 41
Тема 15 Изучение эпифитной микрофлоры зерна…….46
Тема 16 Определение в муке и крупах возбудителя «картофельной болезни» хлеба. 48
Библиографический список 50