

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МОСКОВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ

Кафедра технологии продуктов питания и экспертизы товаров

Авторы: Е.И. Кострова, Е.В. Журавко

Лабораторный практикум по

**МИКРОБИОЛОГИИ**

для студентов специальностей:

2701 – Технология хранения и переработка зерна

2703 – Технология хлеба, кондитерских и макаронных изделий

2704 – Технология сахаристых продуктов

2705 – Технология бродильных производств и виноделия

2707 – Технология жиров и эфирных масел

2708 – Технология консервов и пищеконцентратов

2710 – Технология рыбы и рыбных продуктов

2712 – Технология продуктов общественного питания

3511 – Товароведение и экспертиза товаров  
всех форм обучения

Москва

2003 г.

## Содержание

Введение

Работа 1. Микроскоп и техника микроскопирования микроорганизмов.....	5
Устройство оптического микроскопа МБИ.....	6
Техника микроскопирования.....	9
Правила обращения с микроскопом.....	10
Задание.....	11
Работа 2. Морфология бактерий и техника их микроскопирования.....	11
Приготовление фиксированных препаратов бактерий.....	13
Прижизненное наблюдение.....	14
Окрашивание препаратов и приготовление красителей.....	15
Окраска по Граму.....	16
Задание 1,2,3.....	18
Работа 3. Морфология дрожжей и их микроскопирование.....	18
Задание 1,2.....	20
Работа 4. Изучение морфология основных видов мицелиальных грибов, имеющих значение в пищевой промышленности.....	21
Приемы техники микроскопирования мицелиальных грибов.....	26
Задание 1,2.....	28
Работа 5. Приготовление и способы стерилизации питательны сред, воды и посуды, используемых в микробиологической практике.....	28
Способы и режимы стерилизации питательных сред,	

воды и посуды.....	31
Задание.....	34
Работа 6. Методы количественного учета и анализа состава микрофлоры разных видов пищевого сырья, полуфабрикатов и готовой продукции.....	34
Работа 7. Особенности состава микрофлоры и методов ее определения и контроля в некоторых основных видах пищевого сырья и получаемых из него продуктов.....	39
Микрофлора зерна и муки и методы ее определения .....	39
Задание.....	41
Микрофлора молока, молочных продуктов и методы ее определения.....	41
Задание.....	45
Микрофлора сливочного масла и маргарина.....	46
Задание.....	47
Микрофлора мяса и методы ее определения.....	47
Задание.....	49
Микрофлора рыбы и рыбных продуктов.....	49
Задание.....	52
Микрофлора сахара и методы ее определения.....	52
Задание.....	52
Микрофлора солода и ее определение.....	53
Задание.....	54
Микрофлора свежих плодов и овощей.....	54
Задание.....	59
Микрофлора квашенных овощей.....	59
Задание.....	60

Микрофлора баночных консервов и методы ее определения.....	60
Задание.....	64

Работа 8. Методы учета и анализа микрофлоры воды, воздуха, оборудования и других объектов, связанных с производством пищевых продуктов.....	65
---	----

Микробиологическое исследование воды.....	65
---	----

Задание.....	67
--------------	----

Исследование микрофлоры воздуха.....	67
--------------------------------------	----

Задание.....	69
--------------	----

Санитарно-бактериологическое исследование оборудования, инвентаря, рук работающих и других объектов, связанных с производством пищевой продукции.....	69
---	----

Задание.....	70
--------------	----

Работа 9. Превращение микроорганизмами безазотистых и азотосодержащих органических веществ (процессы брожения и гниения).....	70
---	----

Спиртовое брожение.....	70
-------------------------	----

Маслянокислое брожение.....	72
-----------------------------	----

Аммонификация или гниение белковых веществ.....	73
---	----

Приложение – питательные среды.....	74
-------------------------------------	----

Литература.....	76
-----------------	----

## **ВВЕДЕНИЕ**

Настоящий практикум по технической микробиологии предназначен для студентов дневной, вечерней и заочной формы обучения, по специальностям 2701, 2703, 2704, 2705, 2707, 2708, 2710, 2712 и 3511(Хранение и технология переработки зерна, технология хлебопекарного, кондитерского и макаронного производства, технология сахаристых веществ, технология виноделия и пивоварения, технология производства жиров, технология консервирования, технология рыбных продуктов, технология продуктов общественного питания, товароведения и экспертизы товаров).

Практикум имеет целью ознакомить студентов с морфологией и методами микроскопирования бактерий, дрожжей, мицелиальных грибов, основами приготовления и способами стерилизации питательных сред и других предметов, используемых в микробиологической практике. Практикум дает представление о методах посева и учета микроорганизмов в сырье, пищевых продуктах, воде, воздухе и других объектах, связанных с производством пищевой продукции.

В целом практикум имеет своей целью помочь самостоятельной работе студентов и облегчить им изучение теоретического и практического курса технической микробиологии.

## **Работа 1. МИКРОСКОП И ТЕХНИКА МИКРОСКОПИРОВАНИЯ**

### **МИКРООРГАНИЗМОВ**

Для изучения морфологических признаков разных групп микроорганизмов

в производственных лабораторных исследованиях пользуются оптическим микроскопом. Современными моделями биологического микроскопа являются микроскопы серии «Биолам».

Микроскопирование является обязательным приемом при повседневном санитарно-бактериологическом контроле на предприятиях, связанных с производством и хранением пищевых продуктов, а также веществ и препаратов микробиологического синтеза (ферментов, витаминов и др.). Микроскопированием определяют чистоту культур промышленных микроорганизмов, изменения их количественного и качественного (группового или видового) состава по ходу процесса производства.

При помощи микроскопирования выявляют постороннюю микрофлору в сырье, полуфабрикатах, готовой продукции, на технологическом оборудовании, мешающую нормальному ходу процесса производства. Выявление нежелательной микрофлоры является сигналом для своевременной санитарной обработки оборудования и других объектов, связанных с производством продуктов питания и продуктов микробного синтеза. Учитывая, что микроскоп служит важнейшим орудием контроля в пищевой промышленности – знакомство с устройством оптического микроскопа и техникой микроскопирования является одним из основных практических навыков, которым должны овладеть студенты в курсе лабораторных занятий по микробиологии. Первые научные описания микроорганизмов принадлежат голландскому исследователю Антонию Левенгуку (1632-1727). Он применил для исследования простой микроскоп, представлявший собой лупу, которая давала увеличение до 300 раз.

Английский физик и изобретатель Роберт Гук сконструировал в 1660 г. микроскоп, состоявший из двух линз: объективной и окулярной. В XVII в. русский академик Л. Эйлер разработал теоретические основы расчетов ахроматических объективов, свободных от хроматической и сферической aberrаций, и в 1774 г. был изготовлен такой микроскоп. В 1827 году итальянский ученый Дон Амичи применил иммерсионный объектив. Работы немецкого физика Э. Аббе (1872) послужили основой для дальнейшего усовершенствования объективов и осветительных систем.

Таким образом, современный оптический микроскоп был сконструирован только в конце XIX века.

### **Устройство оптического микроскопа МБИ-1 (Рис.1)**

Биологический микроскоп (от греческих слов *micro* - малый, *scopos* - смотрю) состоит из трех основных частей: механической, осветительной и оптической.

Механическая часть микроскопа включает штатив, тубус, револьвер, винты с зубчаткой для передвижения тубуса и осветительного аппарата и предметный столик.

Штатив состоит из 2-х частей - нижней ножки или подставки, дающей микроскопу устойчивость, и верхней - тубусодержателя, имеющей форму ручки, за которую держат микроскоп при переносе.

Тубус – зрительная труба микроскопа. Для удобства работы биологический микроскоп МБИ-1 имеет наклонное положение тубуса, что достигается при помощи призмы, которая находится между объективом и окуляром. Наклонный тубус позволяет проводить исследования сидя, причем предметный столик микроскопа всегда расположен горизонтально, что особенно удобно при рассматривании жидких препаратов и при работе с иммерсией.

В верхнюю часть тубуса вставляют сменные окуляры. К нижней части тубуса привинчен так называемый револьверный механизм.

Револьвер состоит из 2-х выпуклых пластинок: верхняя из них наглухо привинчена к тубусу, а нижняя может вращаться вокруг своей оси. Нижняя пластинка имеет гнезда (3 или 4), в которые ввинчиваются объективы.

При вращении этой пластинки любой из объективов может быть подведен под тубус; маленькая пружинка, защелкиваясь в свой паз, удерживает объектив в этом положении.

При установлении объектива на фокус тубус перемещается вдоль оптической оси микроскопа с помощью двух винтов.

Один из них – кремальер а или макрометрический винт служит для грубой наводки. При малом увеличении микроскопа пользуются только макрометрическим винтом. Другой винт дает очень небольшие перемещения тубуса и называется микрометрическим. Этот винт служит для точной установки объектива на фокус при использовании большого увеличения (объективы 40х и 90х). Полный поворот микрометрического винта перемещает тубус лишь на 0,1 мм, а так как барабан винта разделен на 50 делений, то поворот на одно деление перемещает тубус на 0,002 мм или 2 мкм/1 микрометр – 1/1000 мм/.





зажима (клеммы), которые служат для закрепления препарата при микроскопировании. Столик перемещается в двух взаимно перпендикулярных направлениях при помощи 2-х винтов, находящихся справа и слева, что позволяет рассматривать препарат последовательно в разных местах.

Осветительная часть микроскопа представлена конденсором Аббе, который состоит из нескольких линз, закрепленных в оправу и передвигающееся вверх и вниз при помощи винта. С помощью конденсора лучи, отраженные от источника света (зеркало или светильник) направляются через систему линз в объектив микроскопа и освещают исследуемый препарат.

При поднятии и опускании конденсора изменяется угол преломления лучей, вследствие чего изменяется степень освещенности препарата. Чем ниже положение конденсора, тем меньше освещение препарата и наоборот. При работе с иммерсионными объективами(90x) конденсор обычно поднимают до уровня предметного стекла, при работе с малыми и средними объективами конденсор несколько опускают.

На нижней поверхности конденсора укреплена ирис-диафрагма. Она состоит из нескольких металлических пластинок, произвольно сдвигаемых при помощи рычажка. Диафрагмой регулируют количество лучей, посылаемых на объект.

При малом увеличении (объектив 8x) диафрагму конденсора почти закрывают, пока не получится четкое изображение предмета.

Диафрагму суживают при ярком освещении.

Оптическая часть микроскопа состоит из объективов и окуляров. Объективы являются наиболее важной и ценной частью микроскопа. Каждый объектив представляет сложную систему специально отшлифованных линз, помещенных в цилиндрическую оправу. На верхнем конце оправы имеется нарезка, при помощи которой объективы привинчиваются к револьверу.

Передняя линза, обращенная к предмету, называется фронтальной. Именно ею производится увеличение. Увеличительная способность объектива зависит от кривизны линзы. Чем больше кривизна фронтальной линзы, тем

большее увеличение дает объектив. Биологические микроскопы МБИ-1 обычно снабжены тремя объективами с собственным увеличением 8х (восьмикратным), 40х (сорокакратным) и 90х (девятидесятикратным), которые указываются на оправе объективов.

Другие линзы, следующие за *фронтальной* линзой объектива, называются *коррекционными*. Они служат для устранения оптических недостатков изображения.

Объективы 8х и 40х являются сухими системами, так как при работе с ними между препаратом и фронтальной линзой объектива находится воздух. Объектив 90-х называется иммерсионным так как при работе с ним между объективом и предметным стеклом наносят каплю иммерсионного масла.

Когда предмет рассматривается сухими системами, то световые лучи, идущие в объектив, проходят через неоднородные среды, различающиеся показателем преломления. Так, показатель преломления стекла  $n = 1,52$ , воздуха  $n = 1$ . Поэтому световые лучи, попадая из среды более плотной (стекла) в менее плотную (воздух) сильно отклоняются от вертикальной оси и не все попадают в объектив микроскопа, особенно при малых размерах линз. При пользовании иммерсионным объективом световые лучи проходят через однородную среду, т.к. показатель преломления иммерсионного (кедрового) масла  $n = 1,515$ . Поэтому в иммерсионной системе лучи проходят не преломляясь, не рассеиваясь и не изменяя своего направления, попадают в объектив. Ход лучей в сухой иммерсионной системе представлен на рисунке 2.

Окуляры вставляются в верхний конец зрительной трубки (тубуса). Каждый окуляр состоит из 2-х плосковыпуклых линз, заключенных в общую трубку. Линзы обращены выпуклой стороной к объективу и удалены друг от друга на расстояние, равное полусумме их фокусных расстояний. Верхняя линза называется глазной, нижняя - собирающей. Увеличение окуляра указывается на самом окуляре: 7х, 10х, 15х в микроскопе МБИ-1. Чем больше собственное увеличение окуляра, тем меньше фокусное расстояние его линз, тем он короче.

Окуляр увеличивает изображение, даваемое объективом, не прибавляя новых деталей структуры рассматриваемого предмета.

Для того чтобы определить общее увеличение микроскопа, нужно увеличение объектива умножить на увеличение окуляра. Так, например, если имеем окуляр 15х, а объектив - 40х, то рассматриваемые объекты будут увеличены в 600 раз (15х40).

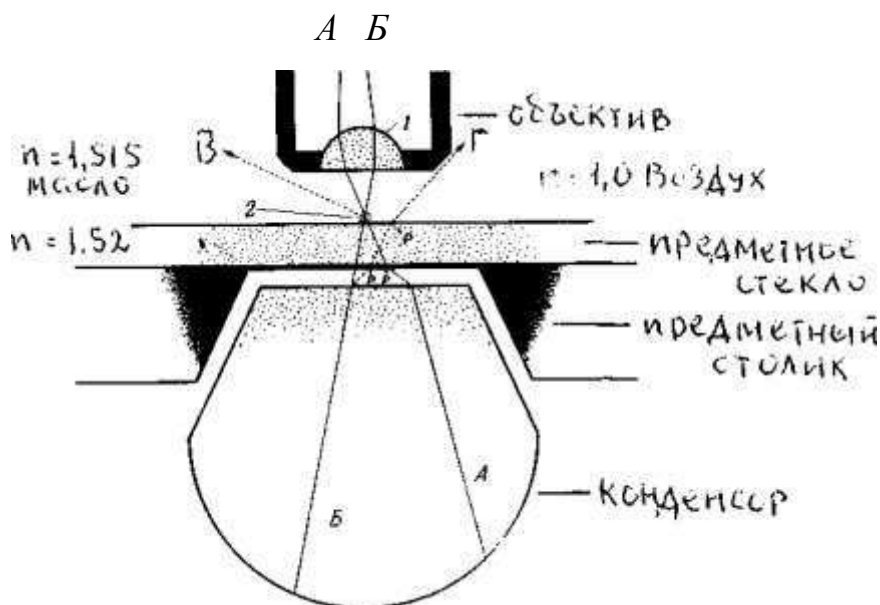


Рис.2.

А, Б – иммерсия  
В, Г – сухая  
система

При микроскопировании имеет значение не только собственное увеличение микроскопа, но и его разрешающая способность, т.е. наименьшая видимая структура в микроскоп. Разрешающая способность зависит только от объектива, т.к. окуляр увеличивает лишь изображение даваемое объективом. Пределом видимости оптического микроскопа являются объекты не менее 0,2 мкм. В виду того, что многие бактерии имеют размеры клеток порядка 1-2 мкм,

то детали строения их клеток лежат на границе разрешающей способности микроскопа.

### **Техника микроскопирования**

При микроскопировании рекомендуется пользоваться следующими приемами:

1. Препарат помещают на предметный столик микроскопа и закрепляют его боковыми зажимами.

2. Вращая револьвер, устанавливают объектив малого увеличения 8х.

3. Находят правильное освещение препарата. Для этого, пользуясь плоским зеркалом, или светильником направляют свет от источника в конденсор микроскопа, стремясь получить равномерное освещение поля зрения. Лучшее освещение подбирают поднятием или опусканием конденсора и при помощи диафрагмы.

4. Находят изображение при малом увеличении (объектив 8х), фокусируя макрометрическим винтом.

5. Без поднятия тубуса, вращая револьвер, заменяют объектив малого увеличения (8х) на объективы большего увеличения (40х,90х).

а) При работе со средним увеличением (объектив 40х) диафрагму конденсора слегка приоткрывают, чтобы усилить освещение. Фокусируют при помощи микрометрического винта.

б) При использовании иммерсионного объектива (90х) открывают диафрагму конденсора, чтобы увеличить свет. На препарат наносят каплю иммерсионного (кедрового) масла. Затем, глядя на препарат сбоку (для контроля, чтобы не раздавить стекло и не поцарапать фронтальную линзу объектива), очень осторожно погружают объектив 90х в масло почти до соприкосновения с поверхностью стекла, работая макрометрическим винтом. Далее очень медленно поднимают тубус при помощи макровинта до появления

в поле зрения изучаемого объекта. Наконец, резкость изображения устанавливают микрометрическим винтом.

Изучаемые объекты, как правило, принято зарисовывать. Для этого препарат помещается в поле зрения микроскопа в положении наиболее удобном для зарисовки, что достигается передвижением предметного столика. Зарисовка производится по возможности точно в отношении размера, формы, расположения клеток бактерий, дрожжей, органов спороношения мицелиальных грибов и т.д.

### **Правила обращения с микроскопом**

1. Микроскоп следует оберегать от пыли, т.е. хранить в футляре или под колпаком.

2. Нельзя оставлять микроскоп на солнце или около зажженной горелки, т.к. может расплавиться канадский бальзам, которым склеены линзы в объективах.

3. Окончив просмотр препарата, сначала поднимают тубус, а затем снимают со столика препарат.

4. По окончании работы с микроскопом, подняв тубус и поставив объектив в удобное положение, осторожно, протирают его фронтальную линзу при помощи чистой мягкой хлопчатобумажной ткани или специальной фланели.

5. Особое внимание обращают на иммерсионный объектив, масло с поверхности которого удаляют указанной тканью, смоченной очищенным бензином или спиртом.

*Нельзя допускать присыхания масла на объективе.*

6. Особенно бережно необходимо относиться:

а) к микрометрическому винту - не делать полных оборотов.

б) к иммерсионному объективу, т. к. из-за короткого фокусного расстояния его фронтальной линзы, легко можно раздавить предметное стекло с препаратом, что может привести к появлению царапин на линзе.

### **Задание**

1. Ознакомиться с устройством оптического микроскопа, правилами обращения с микроскопом и техникой микроскопирования с применением сухих систем и иммерсионным объективом.

## **Работа 2. МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ И ТЕХНИКА ИХ МИКРОСКОПИРОВАНИЯ**

Бактерии объединяют обширную группу в основном одноклеточных микроорганизмов, различающихся по форме, размерам, взаимному расположению клеток, наличию или отсутствию спор, жгутиков, капсул и т. д. (Рис. 3,4).

Для определения группы или вида бактерий, прежде всего, изучают их морфологические признаки: формы и сочетания клеток, их размеры, подвижность, способность к спорообразованию, отношение к окраске по Граму, наличие капсул и клеточных включений. Изучение морфологических признаков бактерий осуществляется обычно с помощью оптического микроскопа.

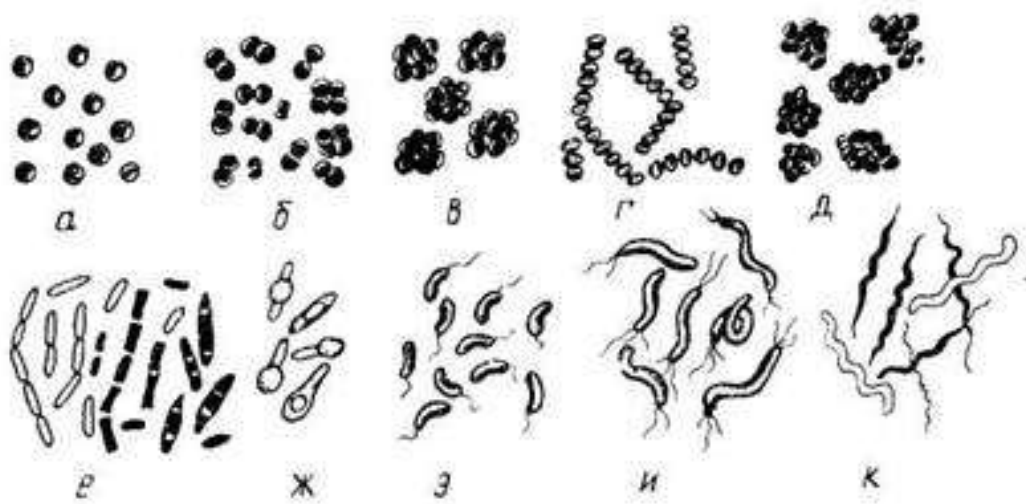


Рис. 3. Основные формы бактерий:

а — микрококки; б — диплококки и тетракокки; в — сарцины; г — стрептококки; д — стафилококки; е, ж — палочковидные бактерии; з — вибрионы; и — спириллы; к — спирохеты



Рис. 4. капсулы, споры и жгутики бактерий:

а-капсулы; б-форма и расположение спор; в-монотрихи; г-лофотрихи; д-перитрихи.

Для изучения бактерий под микроскопом готовят препараты на предметном стекле. Предметные стекла – это пластинки из тонкого стекла (76x26 мм) с хорошо отшлифованными краями. Сверху препарат закрывается покровным стеклом. Их размеры – 18x18, 20x20 мм и др. Все стекла (предметные и покровные) должны быть совершенно чистыми и обезжиренными. Стекла считаются чистыми в том случае, если вода легко расплывается на поверхности стекла, не образуя капель шаровидной формы.

Очистка новых стекол производится в течение 10 минут в 1% растворе соды с последующей промывкой дистиллированной водой, затем слабой соляной кислотой и вновь дистиллированной водой. Стекла бывшие в употреблении, выдерживаются и концентрированной серной кислоте, промываются водой, кипятятся в 2% растворе соды в течение 10 минут, после чего тщательно промываются дистиллированной водой.

Обезжиренные стекла хранят в закрытой чистой коробке и при употреблении следует их брать так, чтобы не прикасаться к их поверхности.

Микроскопирование бактерий можно проводить, рассматривая их как в живом состоянии, так и в мертвом, в специально приготовленных окрашенных препаратах. Последние весьма широко используются в практике, т.к. вследствие слишком малых размеров клеток бактерий, в живом состоянии не удастся рассмотреть некоторые детали их строения, (оболочка, включения, наличие спор), в то время как они более четко выявляются при окрашивании мертвых клеток специальными красками.

## Приготовление фиксированных и окрашенных препаратов бактерий

На лабораторных занятиях студенты получают пробирки или чашки Петри с культурами бактерий, выращенных на соответствующих питательных средах. При приготовлении препарата необходимо соблюдать определенные правила. Материал из пробирки или чашки с поверхности агаровой среды берут бактериологической петлей, предварительно обожженной в пламени горелки. В ходе дальнейшей работы петлю прокаливают до красного каления перед каждым очередным пассажем и после него (взятие из пробирки капли воды, нанесение ее на стекло, снятие культуры с питательной среды, распределение по поверхности стекла и т.д.). После прокаливания петлю охлаждают на воздухе (держат 2-3 с. ни к чему не прикасаясь), после чего приступают к выполнению очередного этапа.

Приготовление препарата состоит из следующих операций:

**1. Приготовление мазка.** На обезжиренное предметное стекло из жидкой среды наносят прокаленной и охлажденной петле каплю исследуемой культуры бактерий и равномерно распределяют ее на поверхности стекла тонким слоем. С твердой питательной среды культуру бактерий петлей вносят в каплю водопроводной воды и тщательно размазывают кругообразными движениями. Получается мазок.

**2. Высушивание.** Мазок подсушивают на воздухе в течение 1-2 мин.

**3. Фиксация.** Высушенный мазок фиксируют в пламени горелки.

Фиксация имеет целью: убить клетки микробов, обеспечить их лучшее прилипание к стеклу и тем самым предохранить препарат от смывания, сделать мазок более восприимчивым к окраске, т.к. мертвые клетки лучше окрашиваются, чем живые.

Простейшим способом является фиксация пламенем. С этой целью предметное стекло с препаратом захватывают большим и указательным пальцами и проводят 3-4 раза через верхнюю часть пламени горелки.

Достаточность нагревания определяют путем прикладывания предметного стекла к руке. Если при этом ощущается легкое жжение, то препарат можно считать фиксированным.

**4.Окрашивание.** Фиксированный препарат через полоску фильтровальной бумаги обливается раствором краски (например, фуксина) с выдержкой 1,5-2 мин.

**5.Промывание.** Через 1,5-2 мин. Полоску снимают и препарат с боковой стороны стекла промывают легкой струей водопроводной воды. При этом смывается излишек краски, но сохраняется краситель адсорбированный клетками бактерий. В правильно окрашенном и хорошо промытом препарате поле зрения остается светлым и чистым, окрашенными оказываются только клетки бактерий.

**6.Высушивание.** Препарат обсушивают досуха с площадью полосок фильтровальной бумаги.

**7.Микроскопирование.** На сухой мазок наносят каплю иммерсионного масла изучают препарат с помощью объектива 90х.

### **Прижизненное наблюдение**

Некоторые палочковидные бактерии являются подвижными. Подвижность обусловлена наличием у них жгутиков, тончайших протоплазматических выростов, которые не видны при микроскопировании в оптическом микроскопе. Наличие жгутиков является видовым признаком и всегда учитывается при определении вида бактерий.

Для изучения подвижности обычно берут односуточные или двухсуточные культуры и готовят из них препарат в раздавленной или висячей капле.

На обезжиренное предметное стекло наносят каплю воды, в которую петлей вносят небольшое количество исследуемой культуры бактерий с твердой питательной среды и размешивают до получения однородной

суспензии. Если микроорганизмы выращены в жидкой среде, то берут на стекло капли исследуемой жидкости петлей или стерильной пипеткой. Капля накрывается покровным стеклом.

Одиночные пузырьки воздуха, оставшиеся под стеклом, не мешают наблюдению. Если их много, то препарат следует переделать. При опускании стекла на каплю прикасаются ребром стекла к краю капли и, постепенно наклоняя, опускают стекло. Капля не должна быть большой, чтобы жидкость не приливалась за края и не попадала на верхнюю сторону покровного стекла. Препарат не должен быть слишком густым, чтобы микробные клетки не заслоняли друг друга. Густые препараты разбавляют водой. Приготовленные препараты рассматривают немедленно, т.к. они быстро высыхают. Для микроскопирования на поверхность покровного стекла наносят каплю иммерсионного масла и рассматривают препарат с объективом 90х, в затемненном поле зрения.

Исследование препарата в раздавленной капле позволяет выявить форму, размеры, подвижность клеток.

Активное движение бактерий следует отличать от механического или пассивного движения. Активно двигающиеся бактерии проплывают через все поле зрения, перегоняют друг друга, меняют направления, совершают вращательные движения. Механическое или пассивное движение наблюдается в высыхающей капле, когда в ней возникают токи жидкости увлекающие клетки, которые движутся с одинаковой скоростью в одном направлении. Клетки бактерий можно наблюдать также в раздавленной капле с прижизненной окраской.

Для этого используются малоцентрированные растворы красок (в концентрации от 0,01 до 0,0001%), которые не оказывают губительного действия на живую клетку и дифференцированно окрашивают ее содержимое, позволяя более детально изучать некоторые особенности микробной клетки, например, включения отдельных запасных питательных веществ (гликоген, гранулеза и др.).

Для прижизненного окрашивания применяются: нейтральная красная, метиленовая синь, раствор люголя и др. краски.

Прижизненная окраска используется также для того, чтобы выявить мертвые клетки, т.к. последние легко окрашиваются, а живые клетки долгое время не пропускают краску через свою оболочку и остаются неокрашенными.

### **Окрашивание препаратов и приготовление красителей**

В лаборатории практике для окрашивания микробных клеток применяются преимущественно анилиновые краски, которые по своим химическим свойствам подразделяются на основные и кислые.

Из основных красок наиболее часто используются : нейтральная красная, основной фуксин(красные краски), генциан-виолет, метил-виолет(фиолетовые), метиленовая синь (синяя), малахитовая зелень (зеленая) и др.

Из числа кислых красок используется кислый фуксин, эозин (красные) и некоторые другие.

Для изготовления растворов красителей берут сухие анилиновые краски в виде порошков, из которых готовят насыщенные спиртовые растворы. Из этих растворов, путем 5-10 кратного разведения дистиллированной водой, готовят спиртоводные растворы, которые уже используются для окрашивания микробных клеток.

Растворы для окраски фиксированных препаратов:

**1.Метиленовая синяя.** Насыщенный спиртовой раствор готовят разведением 3 г сухой краски в 100 мл 95° спирта. Через 2-3 дня из полученного раствора приготавливают спирто-водные растворы в концентрации 1:10 или 1:40. Для приготовления таких растворов смешивают 1 мл насыщенного спиртового раствора с 10 мл дистиллированной воды (1:10) или с 40 мл воды (1:40).

**2.Фуксин основной.** 10 г краски растворяют в 100 мл 95° спирта. 10 мл насыщенного спиртового раствора разводят в 100 мл дистиллированной воды (1:10).

**3.Фуксин Циля.** К 100 мл 5% раствора карболовой кислоты прибавляют 10 мл насыщенного спиртового раствора основного фуксина. Карболовая кислота улучшает проницаемость оболочки, облегчает восприятие краски протоплазмой клетки. Поэтому фуксин Циля применяют с целью окраски бактерий и спор бацилл с трудом воспринимающих краску. Карболовая кислота предохраняет краску от порчи и фуксин Циля можно хранить в течении нескольких месяцев.

**4.Фуксин Пфейффера.** Разводят фуксин Циля в 10 раз дистиллированной водой. Эту краску готовят непосредственно перед окраской препарата, т.к. она быстро разлагается.

**5.Генициан-виолет.** Сначала готовят насыщенный спиртовой раствор, для получения которого берут 10 г краски на 100 мл 95° спирта, и смесь настаивают трое суток, время от времени встряхивая. К отстоявшемуся раствору добавляют 100 мл 3% раствора карболовой кислоты. Полученную смесь перемешивают, тщательно фильтруют через плотный бумажный фильтр и разливают в капельницы.

При стоянии раствора в капельнице происходит медленная кристаллизация и осаждение части краски. Выпавшие кристаллы, попадая на окрашиваемый препарат, затемняют микроскопическую картину. Поэтому при окрашивании препаратов капельницы не встряхивают и берут только прозрачный раствор краски. Генициан-виолет используется для окраски по Граму.

**6.Раствор Люголя.** 2г КJ растворяют в 5 мл дистиллированной воды и в этот раствор добавляют 1 г йода. Для ускорения растворения эту смесь растирают в фарфоровой ступке, после чего доливают водой до 300 мл. Используется при окраске бактерий по Граму.

Растворы красителей после изготовления фильтруют, разливают в склянки с притертыми пробками и сохраняют в темном месте. Для повседневной работы краски разливают в капельницы с притертыми пробками. Следует учитывать, что при длительном хранении растворов кристаллы краски могут выпадать в осадок, поэтому препарат рекомендуется окрашивать через полоску фильтровальной бумаги.

В лабораторной практике пользуются простыми и сложными методами окраски микробных клеток.

При простой окраске на фиксированный мазок наносят раствор какого-либо одного красителя, например, разведенного фуксина, который интенсивно окрашивает вегетативные клетки бактерий.

Сущность сложных методов окраски заключается в том, что препарат окрашивают не одной, а двумя или большим количеством красок.

### **Окраска по Граму**

Наиболее широко в микробиологической практике применяется сложный метод окраски по Граму (предложен впервые в 1884 г. датским ученым Х. Грамом). Метод является одним из важнейших опознавательных признаков при определении вида бактерий.

Сущность метода окраски по Граму заключается в том, что все бактерии по способности окрашиваться красителями (генциан-виолет или кристаллвиолет с йодом) делятся на две группы. К одной относятся бактерии, в клетках которых комплекс, образуемый указанными красителями, сохраняется после обработки их спиртом. Такие клетки в результате окраски приобретают темно-фиолетовый цвет и получили название грамположительных (грамм+). Например, роды спорообразующих бактерий - *Bacillus*, *Clostridium*, среди бесспорных – роды *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Sarcina*, *Leuconostoc* и др.

К другой группе относятся виды, которые не способны удерживать красящий комплекс и обесцвечиваются при обработке спиртом. Их называют грамотрицательными (грам-). К числу их принадлежат многие виды неспорообразующих палочковидных бактерий, в т.ч. роды *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus* и др.

Способность или неспособность клеток удерживать красящий комплекс в настоящее время связывают с химическим составом и структурой клеточных стенок бактерий. В оболочках грам + бактерий содержится больше гликопептида муреина, полисахаридов и тейхоевые кислоты. Они имеют достаточно плотную многослойную структуру. В клетках грам + бактерий генциан-виолет и йод образуют прочное соединение с цитоплазмой, которое не извлекается спиртом. Они сохраняют фиолетовый цвет генциан виолета и при дополнительном окрашивании фуксином Пфейффера.

Оболочки грам-бактерий однослойны, в них отмечено высокое содержание липидов в виде липопротеидов и липополисахаридов. Грам-бактерии при обработке спиртом обесцвечиваются, т.к. у них генциан-виолет не фиксируется в цитоплазме. При дополнительном окрашивании фуксином клетки бактерий окрашиваются только в бледнорозовый цвет.

Грам + отличаются от грам - не только своим отношением к окраске, но и рядом биологических свойств и особенностей. Большинство грам + видов обладают повышенной устойчивостью к обезвоживанию, термической обработке, радиоактивным и другим типам излучений. В тоже время грам - бактерии более устойчивы к действию щелочей и протеолитических ферментов, а также антибиотиков.

Окраску по Граму используют при определении степени загрязнения пищевых продуктов посторонней, в т.ч. условно патогенной (кишечная группа) микрофлорой, для выяснения диапазона действия антибиотиков и др. целей. Следует учитывать, что некоторые виды бактерий будучи грам + в молодом возрасте, в старых культурах не все интенсивно красятся по Граму. Поэтому для окраски следует брать односуточные или двухсуточные культуры и, кроме



того, пользоваться для сравнения контрольными культурами (стандартами), отношение которых к окраске по Граму заранее известно.

Окраска по Граму проводится следующим образом:

1. На одном предметном стекле готовят три мазка из бактериальных культур: заведомо известной Грамположительной, исследуемой и заведомо известной Грамотрицательной.

2. Мазки высушивают и фиксируют пламенем.

3. Окрашивают карболовым раствором генцианвиолета в течение 1-2 мин.

4. Краску удаляют стряхиванием, на мазки наносят раствор Люголя (раствор У в КУ) и выдерживают 1-2 мин. до почернения мазка.

5. Сливают раствор Люголя и на препарат наносят несколько капель 96% спирта и слегка покачивая стекло, выдерживают его до осветления мазка. (20-30с).

Препарат немедленно промывают водой. От обработки мазка спиртом зависит результат всего окрашивания: при недостаточной обработке все бактерии сохраняют окрашивание, при излишней – все клетки обесцвечиваются.

6. Дополнительно окрашивают препарат фуксином Пфейффера (разведенный фуксин) в течение 2 мин.

7. Краску смывают, препарат подсушивают и смотрят с иммерсионным объективом 90х.

Если препарат приготовлен правильно, то в поле зрения видны Грам + темно-фиолетовые клетки и рядом с ними хорошо различаются бледно-розовые Грамотрицательные.

## Задание 1

а) Приготовить фиксированные препараты культур бактерий: *Pseudomonas fluoresceus*, *Bacillus Subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Sarcina* и покрасить фуксином.

б) Микроскопировать все препараты с иммерсионным объективом. Описать и зарисовать, обратив внимание на форму и сочетание клеток. Изучая препараты спорообразующих палочек, найти равномерно окрашенные палочки без спор и палочки со спорами, у которых окрашиваются только контуры и концы клеток, а в центре остаются бесцветные блестящие тельца овальной формы - споры.

## Задание 2

Провести наблюдения активной подвижности бактерий в раздавленной капле. Для этой цели приготовить препараты из культур *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*. Смотреть с иммерсионным объективом.

## Задание 3

Выяснить отношение к окраске по Граму исследуемых культур бактерий: *Bacillus subtilis*, *Escherichiacoli*, *Staphylococcus aureus*, *Erwiniae herbicola*. В качестве контрольных использовать культуры: *Sar* ста(Грам +) и *Pseudomonas fluorescens* (грам-). Микроскопировать с иммерсионным объективом 90х. Зарисовать.

### Работа 3. МОРФОЛОГИЯ ДРОЖЖЕЙ И ИХ МИКРОСКОПИРОВАНИЕ

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

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

Наиболее обычным способом вегетативного размножения, которое характерно для большинства дрожжевых организмов, является *почкование*. Некоторые виды размножаются делением. Кроме почкования и деления многие дрожжи способны размножаться с помощью спор. У некоторых образованию сумок со спорами (асков) предшествует половой процесс, иногда споры образуются без предварительного слияния клеток. Спорообразование у

дрожжей – это одновременно процесс размножения и средство к сохранению жизнеспособности в неблагоприятных условиях.

Все дрожжи, которые размножаются почкованием и способные к спорообразованию называют истинными. Они активно образуют сахара с образованием спирта и углекислого газа и широко используются в производстве спирта, хлебопекарном производстве, в виноделии и в пивоварении. Истинные дрожжи объединены в семейство сахаромицетов (*Saccharomycetaceae*) и отнесены к классу грибов аскомицетов. Типовой род *Saccharomyces*, к которому относятся хлебопекарные, спиртовые, пивные и винодельческие дрожжи.

*Вид Saccharomyces cerevisiae* - хлебопекарные и спиртовые дрожжи. Клетки округлой или яйцевидной формы, размеры 8-10 мкм, одиночные или расположенные группами при почковании, легко образуют споры от 2 до 4. (Рис.5) *Saccharomyces oviformis* (*Sacch/vini*) – винные дрожжи.

Клетки имеют форму эллипса, размером 6-10 мкм, различаются почкованием и образуют споры (2-8).

*Saccharomyces carlsbergensis* – пивные дрожжи, форма клеток овальная, размеры 6-8-12 мкм, размножаются почкованием, споры образуют с трудом. Дрожжи не сбраживающие сахара (или сбраживающие их слишком слабо), размножающиеся путем почкования или деления, но не способные образовывать споры отнесены к классу грибов дейтеромицетов (несовершенные грибы). Такие дрожжи объединены в семейство несакхаромицетов (ложные дрожжи). Из них следует отметить следующие роды:

*Род Torulopsis* – клетки сферической формы, размножаются почкованием, спор не образуют. Вид *Torulopsis albus* часто встречается в замутившемся пиве, придавая ему неприятный привкус, а также как примесь в прессованных дрожжах.

*Род Candida* (Пленчатые дрожжи) имеют клетки округлой, овальной или вытянутой формы, размножаются почкованием. Аэробы, образуют плотные.

Роды *Candida*, *Torulopsis* являются примесью в прессованных хлебопекарных дрожжах отрицательно влияют на процесс производства хлебобулочных изделий.

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

При изучении дрожжей следует отметить, что морфология дрожжевой клетки и активность ее размножения в зависимости от условий и продолжительности развития постоянно меняются.

Молодые дрожжи (12-16 час. культура) имеют тонкую оболочку, невидимую под микроскопом, однородную (гомогенную) цитоплазму, в которой отсутствует вакуоли. Для молодых культур характерно интенсивное размножение (почкование). В благоприятных условиях процент почкующихся клеток в поле зрения достигает 70-80 %. Зрелые дрожжи (24-48 час. культура) имеют зернистую, неоднородную цитоплазму. Количество клеток с вакуолями увеличивается, иногда образуется по 2 и более вакуолей в клетке. Процесс размножения почкованием у зрелых дрожжей замедляется. В поле зрения почкующихся клеток в среднем наблюдается не более 10-15%. Встречается до 2-4% мертвых клеток, которые выявляются путем окрашивания препарата раствором метиленовой синей.

Раствор метиленовой синей проникает только через оболочки мертвых клеток, в результате чего последние окрашиваются в интенсивно голубой цвет, тогда как живые клетки остаются бесцветными.

В старых дрожжах (48 час. и более) оболочка утолщена и становятся видимой при микроскопировании. Цитоплазма зерниста, вакуоли крупные, по несколько в одной клетке. Старые дрожжи не размножаются, их характерным

признаком является наличие большого числа мертвых(окрашенных в синий цвет) клеток в поле зрения.

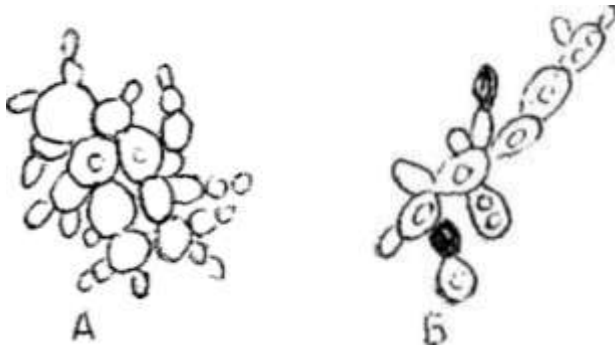


Рис.V. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*

А-молодые; Б - зрелые; В - старые

### Задание 1

Приготовить препараты следующих видов дрожжей:

(истинные)  
дрожжи)

а) *Saccharomyces cerevisiae* (чистая культура)

б) *Saccharomyces cerevisiae* (прессованные

в) *Saccharomyces oviformis* (s.vini)

несовершенные  
(ложные)

г) *Candida mycoderma*

д) *Torulopsis*

Препарат готовят в капле воды на предметном стекле, окрашивают метиленовой синей до темно-голубого окрашивания, накрывают покровным стеклом и смотрят без иммерсии с увеличением 600х (объектив 40х). Отметить

в препарате наличие бесцветных и почкующихся живых клеток и окрашенных в синий цвет (мертвых). Зарисовать все виды дрожжей.

## **Задание 2**

Приготовить указанным способом препараты молодых и старых культур прессованных дрожжей. Отметить особенности в состоянии клеток. Выявить в препарате наличие посторонних клеток микроорганизмов. Сделать рисунки.

### **Работа 4. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ ОСНОВНЫХ ВИДОВ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ, ИМЕЮЩИХ ЗНАЧЕНИЕ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ**

Грибы представляют собой обширную группу организмов, объединяющую около 100 000 описанных видов. Грибы это низшие споровые растения не способные к фотосинтезу. Они нуждаются для своего питания в готовых органических соединений (гетеротрофы). Среди них встречаются сапрофиты, паразиты на растениях и животных и симбионты. Макрофиты и микрофиты. Большинство видов имеет мицелиальное строение тела. Мицелий (грибница) представляет систему тонких ветвящихся нитей (гиф), которые пронизывают субстрат или развиваются на его поверхности. У низших грибов мицелий не имеет перегородок (несептированный), у высших септированный

(поделен перегородками на клетки). Строение клетки грибов типичное для эукариот. Клеточная стенка представляет собой упругую полимерную структуру и состоит на 80-90% из азотосодержащих и безазотистых полисахаридов (хитин и целлюлоза).

Клетка имеет четко оформленное ядро с двойной мембраной и определенным набором хромосом (от 3 до 28). В цитоплазме обнаружено много органелл – митохондрии, рибосомы, лизосомы, аппарат Гольджи, а также запасные питательные в-ва, пигменты, вакуоли и др.

Грибы, в отличие от бактерий, имеют многообразные способы размножения, которые объединены в три основных: вегетативное, бесполое спорообразование и половое спорообразование.

Классификация грибов – сложная задача. Существующие системы постоянно меняются по мере накопления научных данных. При современной классификации все грибы объединены в шесть классов - хитридиомицеты, оомицеты, зигомицеты, аскомицеты, базидомицеты и дейтеромицеты (несовершенные грибы).

Основные виды мицелиальных грибов, используемых в промышленности, или являющиеся распространенными возбудителями порчи с/х сырья и пищевых продуктов относятся к классам Зигомицетов, аскомицетов и дейтеромицетов.

Класс *Zygomycetes* (*Зигомицетов*) - объединяет грибы с хорошо развитым несептированным одноклеточным мицелием. Насчитывается более 300 видов. Наиболее важное практическое значение имеют грибы родов *Mucor*, *Rhizopus*. Воздушные плодоносящие гифы мукоровых грибов называются спорангиеносцами. Эти гифы заканчиваются шарообразными головками-спорангиями, внутри которых находятся эндоспоры (внутренние споры).

При созревании спор оболочка спорангия разрывается и споры, попадая на подходящий питательный субстрат, прорастают, образуя новый мицелий.

Общий вид грибов *Mucor* и *Rhizopus* показан на рис.8 и 9.

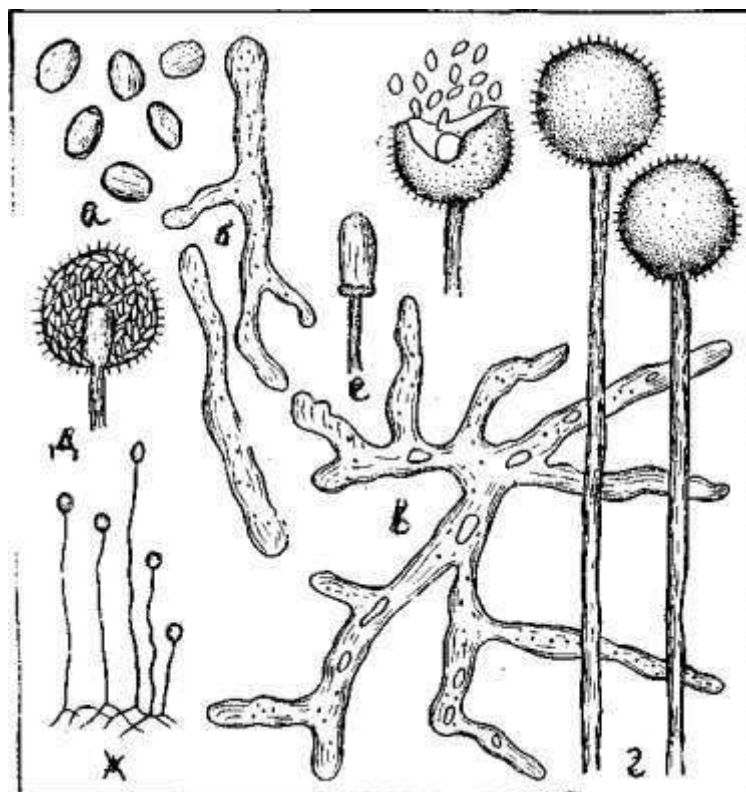


При половом размножении мукоровых грибов происходит слияние двух концевых участков разных гифов с образованием зиготы.

Мукоровые грибы широко распространены в природе. При повышенной влажности могут вызывать порчу различных пищевых продуктов и кормов образуя на них пушистые налеты свинцово-серого, желтовато-серого и других оттенков серого цвета. Они образуют активную пектиназу за счет чего вызывают разрушение межклетников у плодов и ягод, причиняя большой вред на предприятиях плодоперерабатывающей и кондитерской промышленности. Некоторые виды используются для получения ферментов и спиртных напитков.

Из класса *Ascomycetes* (сумчатых грибов) наиболее важное значение в промышленности и при хранении плодово-ягодного сырья, хлебобулочных изделий и других пищевых продуктов имеют грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium* объединяющие до 200 видов.

Размножение осуществляется чаще всего бесполовыми экзогенными (наружными) спорами-конидиями. Половой процесс, сопровождающийся образованием аскоспор в особых сумках (асках) встречается гораздо реже.



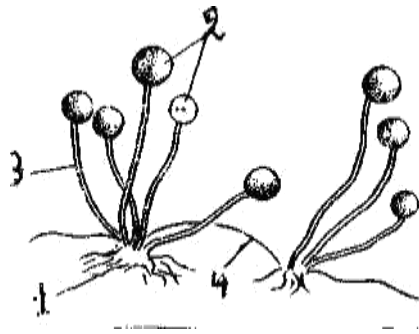


Рис. 8. *Mucor mucedo*:

а – споры, б – прорастающие споры, в – мицелий, г – спорангиеносец,  
д – спорангий в разрезе, е – колонка, ж – общий вид плесени.

Рис.9 Ризопус: 1 – ризоиды, 2 – спорангии, 3 – спорангиеносцы, 4 – столон.

У грибов рода *Aspergillus* мицелий многоклеточный, плодоносящие гифы, называемые конидиеносцами, являются одноклеточными, не ветвятся и заканчиваются шаровидными или булавовидными, а у некоторых видов удлинёнными вздутиями. На поверхности вздутий радиально или более сжато располагаются клетки, имеющие бутылочковидную форму - фиалиды(стеригмы). От их концов отшнуровываются конидии в виде цепочек, часто в таком количестве, что совершенно закрывают вздутие конидиеносца. В результате гриб образует мохнатую круглую или вытянутую головку («одуванчик»). По мере созревания конидии, а затем и колонии разных видов грибов окрашиваются в зелёный, жёлтый, жёлто-зелёный, бурый, кремовый, чёрный и другие цвета. Некоторые остаются белыми. Окраска колоний является одним из основных признаков при определении вида грибов.

Различные представители аспергилловых грибов обладают способностью разлагать те или иные органические вещества, некоторые используются в технике. *Aspergillus niger* (имеющий чёрную окраску конидий), применяется в производстве лимонной кислоты. *Asp oryzae* (оливковый цвет конидий) обладает способностью осахаривать крахмал, выделяет  $\alpha$  и  $\beta$  – амилазу и используется вместо солода в промышленном производстве спирта, пива и пр. Вместе с тем многие виды, являясь нетребовательными к недостатку влаги (ксерофиты), служат преимущественно возбудителями порчи различных обезвоженных пищевых продуктов в том числе зерна и кормов. Некоторые грибы из рода *Aspergillus* (*Asp. flavus*, *Asp. parasiticus*) способны образовывать токсические вещества (афла токсины) в пищевых продуктах и кормах и вызывать отравления у людей и животных.

Другие, образуя огромное количество очень летучих спор, при скармливании сухого корма могут проникать в органы дыхания птиц, вызывая их массовую гибель (аспергиллез).

Грибы рода *Penicillium* имеют многоклеточные ветвящиеся конидиеносцы. На концах разветвлений конидиеносца расположены овальные фиалиды с цепочками конидий.

Общий вид конидиеносца напоминает кисточку, метелку, откуда и название гриба - пенициллиум (кистевик).

Колонии на питательных средах плотные, чаще бархатистые, иногда пушистые. Окраска разнообразная, но большинство имеет голубовато-зеленый, зеленый и серо-зеленый оттенки.

В колониях наблюдаются радиальные зоны роста, на поверхности иногда образуются капли эксудата (жидкости). Многие виды издают острый запах, в частности, плесенный (затхлый) запах.

Широко распространены в природе, вызывают плесневение всевозможных пищевых продуктов, как животного, так и растительного происхождения (зерна, хлеба, плодово-ягодного сырья). Нетребовательны к питательным веществам, в сырых помещениях (мезофилы) могут развиваться даже при сравнительно низких температурах (близких к 0 ° C).

Некоторые виды используются в практике: в медицине для получения антибиотиков (пенициллин), при производстве отдельных сортов сыра (рокфор, камамбер). Другие виды способны образовывать токсины, например *Penicillium expansum* образует сильнодействующий токсин патулин в плодах, плодовых соках и подобных продуктах.

Строение конидиеносцев грибов родов *Aspergillus* и *Penicillium* представлено на рис.10.

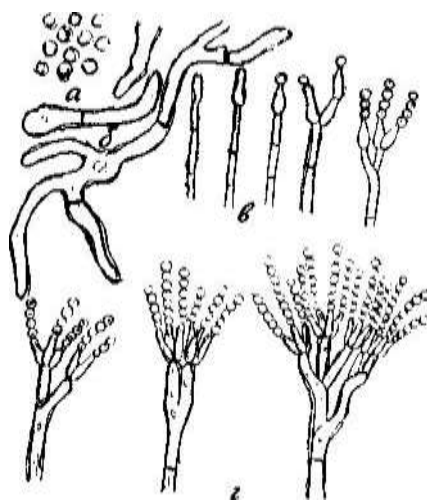
Дейтеромицеты (несовершенные грибы) – представляют собой многочисленный (более 25000 видов) Класс многоклеточных грибов, у которых не обнаружено полового способа размножения. Размножаются чаще всего с помощью конидий разнообразной формы. У некоторых видов вместо конидий образуются оидии или почкующиеся клетки, напоминающие дрожжи (*Oidium lactis*).

Широко распространены в природе, многие вызывают плесневение и порчу («гнили») с/х сырья, различных пищевых продуктов и органических материалов. Некоторые являются возбудителями болезней культурных растений. Наиболее отрицательное значение с хозяйственно-практической точки зрения имеют следующие роды грибов:

Род *Fusarium* объединяет до 800 видов. Образует многоклеточный мицелий с короткими, разветвленными конидиеносцами, на которых располагаются серповидные многоклеточные или более мелкие эллиптические конидии. Разные виды имеют характерную окраску мицелия на питательной среде Чапека от белого, бледно-розового до темно-красного цвета, окрашивая при этом среду. Иногда колонии совершенно белые или имеют оранжевые оттенки.

Грибы этого рода часто встречаются в почве, вызывают болезни-фузариозы зерновых культур, овощей, плодов.

*Aspergillus*: а – конидии; б – мицелий с конидиеносцами разного возраста;  
в – конидиеносец (схема); г – раздвоенные стеригмы



*Penicillium*: а – конидии;

б – прорастающие конидии; в – развитие конидиеносца; г –  
различные конидиеносцы.

Рис. 10. Грибы Аскомицеты.

Род имеет слабоветвящиеся конидиеносцы, несущие на концах овальные споры в виде гроздей. Мецелий и конидии окрашены в темно-оливковый цвет. Образует плоские, плотные, бархатистые колонии темно-оливкового цвета. Выделяет в субстрат темный пигмент. Встречается в почве, на зерне, а также хорошо развивается на продуктах животного происхождения – сыре, масле, колбасе, мясе, яйцах. Может развиваться при малом доступе кислорода.

Род *Alternaria* образует многоклеточные темные конидии округлой или грушевидной формы, сидящие цепочками или одиночно на слабо развитых конидиеносцах. Колонии бархатистые, сначала оливково-коричневые, позже черного цвета. Широко распространены в почве, встречаются в свежесобранном зерне разных культур (полевые грибы), вызывают болезни корнеплодов.

Род *Helminthosporium* образует темноокрашенный мицелий с хорошо развитыми конидиеносцами, на концах которых развиваются крупные веретенообразные темно-оливковые конидии  $(60-134) \times (17-30)$  мкм с несколькими поперечными перегородками. Разные виды являются возбудителями гельминтоспориозов у злаков. Проявляются в виде корневых

гнилей, «черного зародыша» у семян. Могут вызывать значительное снижение урожайности зерновых культур.

Такие представители «полевых грибов» как *Alternaria*, *Cladosporium*, кроме зерна, часто встречаются на маргарине, сливочном масле и других пищевых продуктах.

Род *Oidium*, типичный представитель *Oidium lacti* (молочная плесень) не образует специальных органов плодоношения. Нити мицелия распадаются, начиная с конца на отдельные клетки-оидии, которые и служат средством размножения. Молочная плесень образует белую или кремовую бархатистую пленку на поверхности молочнокислых продуктов, прессованных дрожжей, квашенных плодов и овощей, и т.д. Гриб разрушает молочную кислоту, а также белки и жир этих продуктов и они быстро портятся.

Некоторые представители несовершенных грибов приведены на рис. 11 и 12.

### **Приемы техники микроскопирования мицелиальных грибов**

Молодые 3-4 суточные колонии грибов, выращенные на среде Чапека можно рассматривать непосредственно в чашках Петри. При этом не нарушается строение органов спороношения и они хорошо различимы даже при микроскопировании с объективом х8.

Для наблюдения нужно открыть чашку Петри, поместить ее на столик микроскопа и пользуясь объективом х8 и макровинтом найти органы плодоношения исследуемых грибов.

Для более детального ознакомления с особенностями строения органов разных видов грибов готовят препарат в раздавленной капле. Для этого двумя препаровальными (миколо-гическими) иглами, предварительно обожженными в пламени горелки, отделяют от питательной среды часть грибной колонии и

помещают ее в каплю смеси глицерина с водой (1:4). На предметном стекле пленку расправляют и накрывают препарат покровным стеклом.

При изготовлении препарата грибов родов *Mucor*, *Rhizopus* иглами захватывают только воздушный мицелий, не касаясь питательной среды.

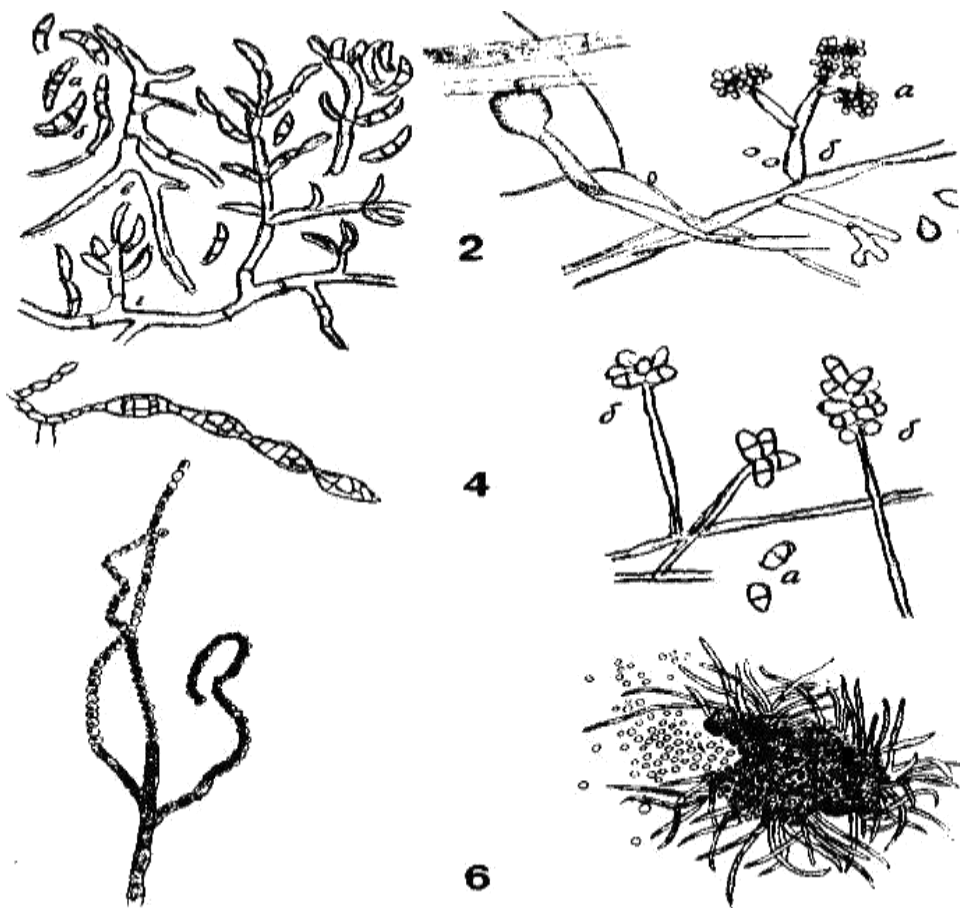


Рис.11. Несовершенные грибы (дейтеромицеты)

1-*Fusarium*: а- конидии; б- прорастающие конидии; в- молодой мицелий; г - мицелий с конидиями; 2 -*Botrytis*: а- конидии; б - мицелий; 3 -  
*Alternaria*:

многоклеточные конидии; 4- *Fructothecium*: а - конидии; б- конидиеносцы; 5 - *Catenularia*: конидии в длинных цепочках; 6- *Phoma betae*: мицелий и конидии.



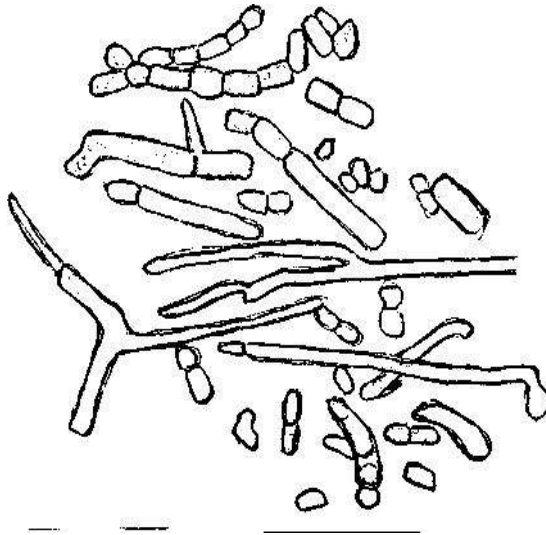


Рис.12 *Oidium lactis* (ув. 600х)

Очень аккуратно переносят частицу мицелия в каплю смеси и осторожно накрывают покровным стеклом.

Препарат грибов в раздавленной капле рассматривают с объективом 40х, т.е. увеличением в 600х.

По современной классификации, по морфологическим и культуральным признакам все грибы рода *Aspergillus* делятся на 14 групп или секций, род *Penicillium* – на 4 секции. Определяя принадлежность гриба к той или иной секции при увеличении в 600 х на препаратах можно рассматривать форму вздутия на конце конидиеносца у грибов *Aspergillus*, строение метелки у грибов *Penicillium*. Применяя иммерсию с объективом 90 х можно исследовать еще более мелкие детали строения разных видов грибов.

## **Задание 1**

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

Зарисовать органы спороношения указанных грибов.

## **Задание 2**

Приготовить препараты грибов *Aspergillus*, *Penicillium* в капле смеси глицерина с водой. Просмотрев приготовленные препараты с объективом x8 (общую картину строения) и заметив участок наиболее четко отражающий характер плодоношения данного гриба, поставить объектив x40 и при этом увеличении зарисовать гифы, органы спороношения и споры.

## **Работа 5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ И СПОСОБЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, ВОДЫ И ПОСУДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ**

Известно, что клетки большинства микроорганизмов (бактерий, мицелиальных грибов, дрожжей) имеют размеры не превышающие нескольких микрометров (мкм,  $1 \text{ мкм} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ мм}$ ) и невидимы невооруженным глазом. Вследствие этого, в микробиологической практике для их выявления, учета, сохранения, а также изучения биологических и технологических свойств живых микроорганизмов применяется их выращивание (культивирование)\* на специальных жидких и плотных питательных средах.

При культивировании на плотных питательных средах из отдельных клеток микроорганизмов, содержащихся в исследуемой пробе того или иного материала (продукта, воды, смыва с оборудования и т.д.) образуются их массовые скопления называемые колониями. Колонии имеют характерные для каждого вида микроорганизмов отличия по размерам, форме, окраске, консистенции и др. признакам. По размерам колонии в большинстве случаев хорошо различимы невооруженным глазом и легко поддаются прямому визуальному подсчету.

Питательные среды используемые для культивирования микроорганизмов должны содержать достаточное количество необходимых для их развития органических веществ - белков, углеводов, витаминов, а также минеральных макро и микроэлементов. Многие виды микробов очень требовательны к составу питательной среды и нуждаются в разнообразном наборе витаминов и ростовых веществ, например молочнокислые бактерии.

Питательные среды могут быть натуральными (естественными) и искусственными. В качестве натуральных сред используются некоторые

продукты растительного или животного происхождения: молоко, животные ткани, вареные овощи (картофель, морковь) и др.

На натуральных средах хорошо развиваются многие виды микроорганизмов, однако ввиду сложного и непостоянного химического состава такие среды мало пригодны для изучения процессов метаболизма у микробов. Наиболее широко используются искусственные или полусинтетические среды, которые готовятся на основе мясных, рыбных и растительных отваров с добавлением дополнительных питательных веществ- пептона, Сахаров, витаминов и др.

По назначению различают универсальные (стандартные) и элективные (избирательные) среды. Универсальные применяются для культивирования многих видов микроорганизмов. Для определения количественного и группового состава мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных бактерий (КМАФАнМ) широко используют: мясопептонный бульон (МБП), и мясопептонный агар (МПА). Мясопептонные среды содержат достаточное количество азотистых соединений, необходимых для роста и развития бактерий, постоянно встречающихся на сырье, полуфабрикатах и разных видах пищевых продуктов.

Не охмеленное солодовое сусло и сусловый агар (СА) являются универсальными для многих видов плесневых грибов и дрожжей. Эти среды содержат сахара, необходимые для жизнедеятельности указанных микроорганизмов.

По физическому состоянию различают жидкие и плотные среды. Жидкие (МПБ и солодовое сусло) используют для выяснения физиолого-биохимических свойств микроорганизмов, для накопления биомассы или продуктов обмена.

Плотные среды готовят путем добавления к жидким желатина или агара. Желатин - вещество белковой природы, которое получается при вываривании костей и хрящей. Для создания плотной среды к МПБ добавляют 10-15% нарезанного желатина, и нагревая, расплавляют его, а затем, охлаждая, дают затвердеть. Но желатин имеет большой недостаток, мешающий в практической работе, так как температура плавления его около 24-27 °С. В настоящее время желатиновые среды используются, главным образом при диагностике микроорганизмов. Известно, что одни виды бактерий разжижают желатин (под действием протеолитических ферментов, содержащихся в клетках), а другие не разжижают. Это характерное свойство используется при определении вида бактерий.

Для выращивания микроорганизмов с целью подсчета количества и изучения внешнего вида колоний широко применяют агаровые среды. Агар-

#### 4

агар добывают из морских водорослей, он состоит, главным образом, из сложных углеводов (полисахаридов). Для получения плотной питательной среды в МПБ или в пивное сусло добавляют 1,5-2,5% агара. Температура плавления агара около 100 °С, что является преимуществом агаровых сред, так как на них можно выращивать культуры микроорганизмов при различных температурах. Использование плотных сред необходимо для следующих целей:

- а) изучение морфологии колоний – при диагностике микроорганизмов;
- б) количественного учета микроорганизмов;
- в) выделения и сохранения чистых культур микроорганизмов;
- г) определения антагонистических свойств и в ряде других случаев.

Элективные среды по сравнению с универсальными обеспечивают преимущественное развитие одного вида (или нескольких) и мало пригодны для развития большинства микроорганизмов. Применяются, главным образом, для выделения микроорганизмов из мест их естественного обитания, а также получения чистых культур из смешанных. Сопутствующие микроорганизмы на элективной среде или совсем не будут развиваться или их развитие наступит позднее. В качестве примеров элективных питательных сред можно указать МПБ и МПА с 8% поваренной соли для культивирования стафилококков, или пиво с добавлениями 2-4% этилового спирта, для выращивания уксуснокислых бактерий. Для определения потребности микроорганизмов в отдельных элементах питания применяются также синтетические среды, которые готовят путем подбора и смешивания различных химических соединений. Примером такой среды являются синтетическая среда-агар Чапека для культивирования мицелиальных (плесневых) грибов. Известно, что важное, иногда решающее влияние на жизнедеятельность микроорганизмов, оказывает реакция среды, т.е. степень ее кислотности или щелочности. При этом реальное влияние оказывает не простое наличие кислоты или щелочи в растворе, а активная кислотность среды, которая зависит от концентрации водородных ионов в среде, т.е. от степени диссоциации кислоты или щелочи на ионы.

Для выражения активной кислотности среды служит условный символ рН, который представляет собой отрицательный логарифм концентрации водородных ионов, взятый с обратным знаком.

Разные виды микроорганизмов развиваются только в определенных границах рН. Для большинства плесневых грибов и дрожжей, молочнокислых, уксуснокислых бактерий наиболее благоприятна слабокислая среда (рН 4,0 - 6,0), остальные бактерии развиваются в нейтральной или слабощелочной среде (рН 6,8-8,0).

При изготовлении питательных сред необходимо каждый раз устанавливать их реакцию. Если реакция не соответствует требованиям данного вида микроорганизма, то среду следует подщелачивать или подкислять, добавляя растворы соответствующих веществ, для подщелачивания — 0,1 nNaOH или 10% раствор пищевой соды, для подкисления - 0,1н. HCl или слабый раствор молочной кислоты. РН среды определяют рН-метром с точностью до 0,2-0,3, или с помощью универсального индикатора.

Из числа плотных питательных сред в микробиологической практике наиболее широко для культивирования разных групп бактерий применяется мясопептонный агар (МПА), а для грибов сусло-агар (СА) и синтетическая среда Чапека (ЧА). Питательные (стандартные) среды-мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), агар Эндо и некоторые другие в настоящее время выпускают в виде сухих порошкообразных концентратов. Из них в лабораторных условиях готовят среды, используемые в работе. Способ приготовления указан на этикетке.

Сусловый агар готовят на основе неохмеленного солодового сусла, которое можно получить на пивоваренных заводах или изготовить в лабораторных условиях.

Для приготовления плотной среды к разбавленному суслу добавляют 2-2,5% агара, расплавляют его при 100°C, фильтруют через вату покрытую марлей, разливают в соответствующую посуду и стерилизуют при 0,5 атм. В течение 20 мин.

Для культивирования мицелиальных грибов кроме сусло-агара в практике используют также синтетические среды, например агар Чапека, (см. приложение).

## Способы и режимы стерилизации питательных сред, воды и посуды



Стерилизацией называется полное уничтожение микроорганизмов в каком-либо объекте: питательных средах, воде, посуде, инструментах и др.

Все подготовленные среды, вода для разведения, а также чистая посуда, применяемая для посева и выращивания микроорганизмов (пипетки, чашки Петри, пробирки, колбы), перед началом микробиологических исследований должны быть обязательно простерилизованы. Питательные среды стерилизуются тотчас после приготовления. Колбы и пробирки с питательными средами и водой перед стерилизацией закрывают ватными пробками. Ватные пробки выполняют роль фильтров и предохраняют простерилизованный материал от попадания посторонних микроорганизмов из воздуха.

Пробки должны быть прочными и долгое время сохранять свою форму. Ватные пробки можно готовить с помощью специальной машины для изготовления пробок. При отсутствии машины пробки готовят следующим образом: кладут на стол тонкий ровный слой ваты, загибают внутрь боковые края и получают ленту, по ширине равную длине пробки. Затем из этой ленты скатывают валик диаметром несколько меньше диаметра сосуда (рис. 13).

Ватные пробки обычно обертывают кусочком марли в один слой. Пробка должна хорошо и достаточно плотно входить в горло сосуда и выступать из него примерно на 3 - 4 см, чтобы ее легко было захватить пальцами.

Рис. 13. Приготовление пробок.



Пипетки, используемые для микробиологических работ, перед стерилизацией заворачивают в бумагу. В широкий конец пипетки обычно вводится препаровальной иглой небольшой кусочек ваты так, чтобы ворсинки не выступали из отверстия пипетки. Бумага для заворачивания пипеток отрезается длинными лентами шириной 5-10 см. Суженый конец пипетки кладут на край ленты под углом в 35-40° и концом ленты тщательно закрывают его. Затем завернутый конец пипетки зажимают пальцами левой руки и вращательными движениями правой руки заворачивают пипетку.

Иногда пипетки не заворачивая помещают по несколько штук в специальные металлические или стеклянные пеналы. Ватная пробка в пипетках обязательно должна сохраняться при их использовании, во избежание попадания в посева посторонних микроорганизмов из ротовой полости. Чистую сухую посуду (чашки завернутые в бумагу) чаще всего стерилизуют в электросушильных шкафах «сухим жаром» при  $t = 150-160^{\circ}\text{C}$  в течение 1,5-2 часов. При таком режиме, как правило, убиваются не только вегетативные клетки микроорганизмов, но и наиболее термоустойчивые споры бактерий. После стерилизации посуду хранят завернутой в закрытых шкафах до момента использования.

Для питательных сред и воды используют стерилизацию нагретым паром. Различают два типа такой стерилизации: 1) стерилизация текучим паром и 2) стерилизация насыщенным паром под давлением.

Стерилизация текучим паром производится в кипятильнике Коха (или в автоклаве при открытом кране для выпуска пара). Аппарат Коха - это металлический цилиндр, накрываемый сверху крышкой с отверстием в ней для свободного выхода пара. На дно аппарата наливают воду и ставят подставку, на которую помещают стерилизуемые предметы.

Текучим паром осуществляют дробную стерилизацию (тиндализацию), которая производится при температуре 100 °С в течении 3-х дней подряд по 30-40 минут ежедневно. В промежутках между прогреваниями питательные среды оставляют при комнатной температуре или выдерживают в термостате для того, чтобы споры, которые оставались после кипячения, могли прорасти в вегетативные клетки, а возникающие молодые клетки уничтожают при повторном нагревании.

Недостатком тиндализации является ее длительность. Однако этим методом широко пользуются в лабораторной практике. Он является незаменимым для стерилизации сред, изменяющих свой состав и свойства при температуре выше 100 °С. Дробно стерилизуют молоко, среды с углеводами, среды с желатиной и др. Метод дробной стерилизации введен английским ученым Тиндалем.

Стерилизация насыщенным паром под давлением (автоклавирование) является самым быстрым и наиболее надежным способом. Она осуществляется в специальном приборе - автоклаве (рис. 14), который представляет собой двустенный герметически закрывающийся котел. Он снабжен воронкой для наливания воды, краном для выпуска воздуха и пара, манометром для определения давления пара внутри котла и предохранительным клапаном.

При стерилизации в автоклаве порядок работы следующий:

1. Заливают через воронку воду до метки (уровень воды виден через водомерное стекло) и внутрь на специальную подставку помещают стерилизуемые предметы.

2. Закрывают крышку автоклава и открывают кран для выхода воздуха и пара.

3. Включают автоклав в электрическую сеть.

4. После закипания воды начинает выходить сильная струя пара из крана. После полного удаления воздуха паром (продувка автоклава) закрывают кран и следят по манометру за давлением. Время стерилизации отмечают с момента установления необходимого давления. Большинство питательных сред, а также водопроводную воду в автоклаве стерилизуют при 1 атм в течении 20-30 мин., что соответствует  $t = 121\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Такая температура убивает не только бактерии, но и их споры. Легко разрушающиеся и карамелизующиеся среды (молоко, сусловый агар, агар Чапека и др.) стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм в течение 20-30 мин., что соответствует  $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

5. После окончания стерилизации автоклав отключают, осторожно выпускают пар, отвинчивают крышку и достают простерилизованные материалы.

Если кран будет открыт слишком рано, то стерилизуемая жидкость может вскипеть и выбросить ватные пробки.

Холодная стерилизация осуществляется фильтрованием через специальные мелкопористые фильтры в заранее простерилизованную посуду. Этот прием холодной стерилизации применяется для тех питательных сред, которые изменяют свой состав и свойства даже при незначительном нагревании.

Сущность этого метода стерилизации основана на том, что малые поры фильтра легко пропускают раствор, но задерживают микроорганизмы, за исключением ультрамикробов (вирусов и бактериофагов).

Бактериальные фильтры готовят из разных материалов. Наиболее часто употребляются фильтры из фарфоровой глины, асбеста и мембранные ультрафильтры. Химический метод стерилизации называется дезинфекцией. Дезинфекция - это способ уничтожения микроорганизмов при помощи сильно действующих химических веществ-антисептиков.

Бактерицидное действие проявляют многие окислители: хлор, перекись водорода, перманганат калия, неорганические кислоты – сернистая борная, органические соединения – формалин, фенолы, этиловый и бутиловый спирты и др.

В лабораторной практике дезинфекцию применяют для обеззараживания рабочего стола, рук, инструментов и т.д.

### **Задание**

1. Приготовить МПА (из сухого концентрата), сусло-агар, среду Чапека. Установить нужную рН. Сделать ватные пробки. Разлить среды в колбы и пробирки (1/3 объема) сдать в стерилизацию.

2. Подготовить к стерилизации посуду - чашки Петри, пипетки, пробирки.

3. Ознакомится с работой автоклава и других способов, применяемых для стерилизации питательных сред, воды и посуды.

## Работа 6. МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО УЧЕТА И АНАЛИЗА СОСТАВА МИКРОФЛОРЫ РАЗНЫХ ВИДОВ ПИЩЕВОГО СЫРЬЯ, ПОЛУФАБРИКАТОВ И ГОТОВОЙ ПРОДУКЦИИ

Наиболее простым и широко распространенным методом количественного учета микроорганизмов в указанных объектах является стандартный метод подсчета выросших колоний на плотных питательных средах в чашках Петри.

Культивирование микроорганизмов на питательных средах осуществляется посевом. *Посевом* называется внесение в стерильную питательную среду какого-либо исследуемого материала для выявления в нем микроорганизмов. Посевы применяются для определения количественного и качественного состава микрофлоры в любом исследуемом объекте: воде, пищевых продуктах, воздухе помещений, поверхности оборудования и т.д.

Посев на плотные питательные среды (МПА, сусло-агар и др.) в чашках Петри проводят двумя способами: глубинными или «газоном».

При глубинном посеве стерильную питательную среду расплавляют на кипящей водяной бане, затем охлаждают до температуры 40-45 °С и заливают, предварительно внесенной на дно чашки Петри посевной материал, примерно 10 мл среды.

Внесенная среда равномерно перемешивается с посевным материалом, путем осторожного вращения (или покачиванием) чашки на ровной поверхности стола. Чашку оставляют на столе до полного застывания среды, на крышке восковым карандашом или специальными чернилами делают соответствующую надпись. Глубинный посев применяют постоянно для учета микроорганизмов в посевах смывов с различных объектов: сырья, пищевых

продуктов, оборудования и т.п. Микробные клетки при глубинном посеве попадают на дно чашки под слой агара, а также на его поверхность. Из клеток образуются колонии разной формы, размера, окраски и т.п., которые затем подсчитываются и изучаются.

При посеве «газоном» предварительно расплавленную среду разливают (по 10-12 мл) в стерильные чашки Петри. На застывшую среду посев микроорганизмов производится петлей в виде параллельных штрихов или внесенный материал равномерно распределяют по поверхности среды стерильным шпателем. Посев «газоном» применяют для выделения чистых культур микроорганизмов из одной колонии, а также при изучении внешнего вида колоний разных видов. Указанный способ используется также для учета микроорганизмов в воздухе (метод оседания).

Все посева помещают в термостат для выращивания. Во избежание попадания на поверхность конденсационной влаги чашки с посевами укладывают в термостат перевернутыми вверх дном.

Для роста и размножения микробов на питательных средах необходимы определенные температурные условия. Дрожжевые и мицелиальные грибы, а также многие сапрофитные бактерии относятся к группе мезофилов, т.е. оптимальной температурой для их развития является 25-30°C. Патогенные микробы лучше растут при температуре 37°C.

Существуют микробы, требующие более низких или более высоких температур для своего развития. Так, например, температурный оптимум психрофилов (холодолюбивых) 6-10°C, а температурный оптимум для термофилов достигает 50-60 °C. Все различия в биологии микроорганизмов необходимо учитывать при их культивировании, в связи с чем посева выращиваются в термостатах, который представляют собой шкафы, где

поддерживаются соответствующая постоянная температура с помощью специальных терморегуляторов.

Для определения количества микроорганизмов в единице массы (в 1 г.) любого продукта, непосредственно в колбу Эрленмейера со 100 мл. стерильной водопроводной воды берут навеску продукта массой от 5 до 10 г. (взвешивают на технических весах с точностью до 1 г.). Затем производят смыв путем взбалтывания пробы в колбе в течение 10 мин. горизонтальными, кругообразными движениями (при этом нельзя смачивать ватную пробку). Получаем 1-ое разведение количества микроорганизмов 1:100. Далее осуществляется разведение путем разбавления полученного смыва в 1000, 10000 и более раз стерильной водой. Для этой цели берут несколько пробирок с 9 мл. стерильной воды в каждой. Стерильной пипеткой вносят 1 мл смыва из колбы в первую пробирку и тщательно перемешивают. Получают разведение 1:1000 из первой пробирки той же пипеткой переносят 1 мл во вторую и получают разведение 1:10 000 и т.д.

Из полученных разведений делают посев по 1 мл. в две стерильные, заранее подписанные чашки Петри. Схема разведений, посев и разливка агара в чашки представлены на рис. 15. следует отметить, что чем больше взято пробирок для разведений, тем больше будет ошибка в конечном подсчете количества микроорганизмов в 1 г. продукт. Внесенный в чашки материал (1 мл смыва) заливают соответствующей, предварительно расплавленной и охлажденной до  $t$  40-45 С, питательной средой. Одну из двух чашек заливают МПА – для вырвщивания колоний бактерий, другую – СА – для выращивания грибов. После застывания среды перевернутые чашки помещают в термостат при  $t = 28-30^{\circ}$  на 48-72 часа. Выросшие на агаре колонии подсчитывают со стороны дна чашки. При этом условно считается, что каждая колония развилась из отдельной микробной клетки. каждую отсчитанную колонию помечают, нанося на ней чернилами точку. Разведение и посев считаются правильно

выбранными, если в чашке выросло от 100 до 500 колоний бактерий и от 20 до 50 колоний грибов.

Чашки, в которых выросло менее 10 колоний бактерий и менее 5 колоний плесеней – в расчет не принимаются. Подсчитав количество колоний на чашке, определяют число микроорганизмов (бактерий и грибов отдельно) в 1г продукта по уравнению:  $A=(b \cdot c)/d$ , где А-количество микроорганизмов в 1г продукта; b-число колоний на чашке; c-разведение (1:100; 1:1000 и т.д.); d-навеска продукта (г).

Например, при подсчете на чашке обнаружено 320 колоний, разведение 1000, навеска продукта 5г. Определяем количество микроорганизмов в 1г продукта:  $(320 \cdot 1000)/5 = 64000$  или  $6,4 \cdot 10^4$  КОЕ/г.

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

По секторам дно чашки расчерчивают карандашом на несколько одинаковых секторов. Затем пересчитывают колонии в 2-3 секторах и среднее число, найденное для одного умножают на количество секторов; Если на чашке с крайним разведением количество колоний подсчитать невозможно, то пользуются счетными камерами. Счетная камера Вольфюгеля представляет собой стеклянную пластину, разделенную на квадраты с площадью 1 см<sup>2</sup> (Рис. 16).

Опрокинутую вверх дном чашку Петри кладут на стеклянную пластинку и считают число колоний в 10 квадратах, расположенных в 2-х взаимно перпендикулярных направлениях. После того как подсчитано количество колоний в 10 квадратах, выводят среднее число на один квадрат (1 см<sup>2</sup>).

Для определения количества колоний на поверхности всей чашки число колоний в 1 см<sup>2</sup> умножают на площадь чашки, равной  $r^2$  (для чашки диаметром 10 см радиус = 5 см).



Рис. 14 Автоклавы:

а) вертикальный; б) горизонтальный

Рис. 15 Схема разведений и разливка агара в чашки Петри

Если в одном квадрате подсчитано 30 колоний, то на всей чашке будет  $30 \times \pi^2 = 30 \times 3,14 \times 5^2 = 2355$  колоний.

Следует отметить, что наряду с доступностью и относительной достоверностью, метод количественного учета колоний имеет и существенные недостатки, которые следует учитывать при проведении работы.

Прежде всего, исходя из вида исследуемого продукта (свежие овощи, плоды, сырое мясо, рыба, полуфабрикаты, обезвоженные продукты и т.д.) нужно выбрать правильное разведение пробы.

Необходимо тщательное соблюдение правил отбора пробы продукта и проведение смыва стерильной водой. Следует заметить также, что метод позволяет учитывать лишь общее количество определенных групп сапрофитных мезофильных аэробных и факультативно-аэробных

микроорганизмов (КМА-ФАНМ), но непригоден для учета анаэробов и некоторых других групп, бактерий.

Кроме метода учета колоний в микробиологической практике на пищевых предприятиях применяется также метод прямого подсчета микроорганизмов под микроскопом. Микробные клетки подсчитывают в счетных камерах разных конструкций: Камера Горяева, Фукс-Розенталя, Тома-Цейса и др. принцип устройства их примерно одинаков (Рис.17).

Счетная камера Горяева представляет собой толстое предметное стекло с нанесенной на ней сеткой. Сетка разделена на определенное число больших и малых квадратов. Постоянной величиной во всех сетках является малый квадрат, сторона которого равна  $1/20$  мм, площадь его  $1/400$  мм<sup>2</sup>.

Для определения процентного содержания мертвых клеток дрожжей в прессованных дрожжах, в заквасках, используемых в хлебопечении, в культурах пивоваренных дрожжей и др. берут каплю суспензии дрожжей наносят на сетку камеры подкрашивают метиленовой синей и накрывают покровным стеклом.

Капля под покровным стеклом должна равномерно без пузырьков распределиться по всей сетке. Камеру помещают на предметный столик микроскопа, с объективом 8, находят сетку и не передвигая ее, заменяют объектив 8 объективом 40. через 1-2 мин. подсчитывают число окрашенных (мертвых) и неокрашенных (живых) клеток в 10 полях зрения. Рассчитывают процентное содержание мертвых клеток.

Счетные камеры Горяева используются и для прямого подсчета бактерий, например молочнокислых бактерий в хлебопечении, а также для прямого подсчета в томатопродуктах.

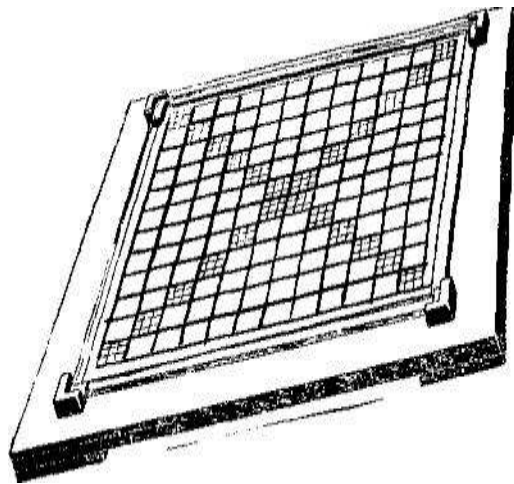


Рис. 16. Счетная камера Вольфгюгеля.

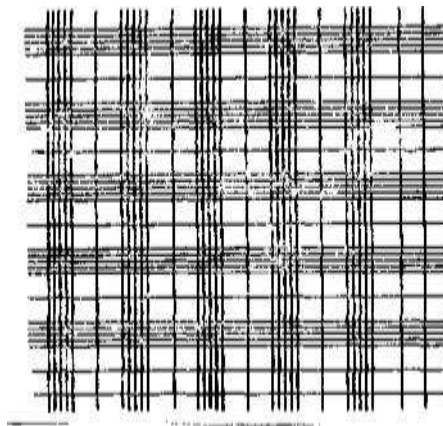


Рис. 17. Счетная камера Горяева.

Выбор метода подсчета колоний на плотных средах, или прямого учета микробных клеток под микроскопом зависит от поставленной задачи и специфических особенностей исследуемых объектов. В некоторых случаях используются одновременно оба метода.

Следует помнить, что при прямом подсчете бактерий учитываются не только живые, но и нежизнеспособные, а также мертвые клетки, что может вуалировать истинную обсемененность продукта микрофлорой. Культивирование

на плотных питательных средах в сравнении с прямым подсчетом является более достоверным методом, вследствие чего этот способ наиболее распространен в микробиологической практике.

После подсчета колоний на чашке, полученных в результате посева того или иного продукта, проводят качественный анализ наиболее характерных групп бактерий и грибов, выросших на МПА, СА или агаре Чапека.

Для этой цели выбирают 1-2 колоний бактерий, хорошо изолированных друг от друга (из числа выросших на чашке в наибольшем количестве). Выбранные колонии отмечают карандашом со дна чашки и описывают их морфологические и культуральные признаки.

Учитывая, что каждый вид бактерий образует свои, характерные для него по внешнему виду колонии, при описании их отмечают следующие признаки:

1. Размер колоний (их диаметр)

2. Форма колоний (круглая, овальная, неправильная, мицелиевидная и др.)

3. Цвет колоний (белый, желтый, кремовый, розовый и др.)

4. Поверхность колоний (гладкая, блестящая, матовая, складчатая, мучнистая и др.)

5. Край колоний (ровный, волнистый, зубчатый, лопастной и др.). Изучают в открытых чашках при малом увеличении микроскопа - 8х.

6. Консистенция колоний (слизистая, крошащаяся, пастообразная и др.). Определяется в процессе приготовления мазка.

Из описанных колоний готовят фиксированные, окрашенные препараты, или препараты в раздавленной капле и смотрят с иммерсионным объективом (см. работу 2).

Описание внешнего вида и микроскопирование колоний дрожжей и мицелиальных (плесневых) грибов проводится согласно методов, приведенных в работе 3 и 4.

## **Работа 7. ОСОБЕННОСТИ СОСТАВА МИКРОФЛОРЫ И МЕТОДОВ ЕЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И КОНТРОЛЯ В НЕКОТОРЫХ ОСНОВНЫХ ВИДАХ ПИЩЕВОГО СЫРЬЯ И ПОЛУЧАЕМЫХ ИЗ НЕГО ПРОДУКТОВ**

Известно, что разные виды пищевого растительного и животного сырья, используемого в пищевой промышленности, имеют сложный и разнообразный химический состав, а также существенно различаются содержащейся в сырье и продуктах многообразной, а иногда и специфичной микрофлорой. Ввиду этого требуется уточнение и детализация стандартных методов определения некоторых групп (или видов) микроорганизмов, применительно к тому или иному продукту.

Очевидно, что при выборе продукта для изучения его микрофлоры, в первую очередь следует использовать сырье и продукты, соответствующие той отрасли промышленности, по которой специализируется студент (хлебопекарная, молочная, рыбная и тд.).

## Микрофлора зерна и муки и методы ее определения

Типичной микрофлорой доброкачественного свежееубранного зерна являются эпифитные бактерии рода *Erwinia* (*Erwinia herbicola*) или «травяная палочка». Количество этих бактерий иногда составляет 90% от общего числа микроорганизмов на зерне, что в определенной степени является показателем свежести зерна и его хорошего качества. Из числа грибов на зерне сразу после уборки выявляются преимущественно т.н. «полевые грибы» - представители класса несовершенных грибов - роды *Alternaria*, *Cladosporium*, *Dematium* и др. При уборке зерна в условиях высокой влажности на нем из числа грибов преобладают грибы рода *Fusarium*, *Helminthosporium*, которые разрушают зародыш и резко снижают всхожесть зерна уже в период его уборки.

При дальнейшем хранении зерна, прошедшего своевременную необходимую послеуборочную обработку (очистку, вентилирование, подсушивание и т.д.), эпифиты и полевые грибы на нем постепенно, а иногда довольно быстро, исчезают.

Общее количество микроорганизмов снижается. Из числа бактерий выявляются в небольших количествах спорообразующие палочки типа *Bacillus sub-tillis*, *Bacillus mycoides* и др. Среди грибов - преобладают плесени хранения – виды *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*. Наиболее активное развитие плесеней хранения и гнилостных бацилл происходит при самосогревании зерна, когда температура в насыпи достигает 30° - 40°С и более. В процессе самосогревания резко ухудшается качество зерна – оно темнеет, слеживается, приобретает посторонние запахи и вкус.

Количественный и качественный состав микрофлоры муки зависит от степени обсемененности микроорганизмами зерна, а также от сортности помола. Поскольку основная масса микробов находится на поверхности зерна,

то в высокосортной муке всегда меньше микробов, чем в муке низкосортной, содержащей большее количество отрубей. Обсемененность муки микрофлорой сильно варьирует не только в зависимости от сорта, но и от условий влажности, температуры и продолжительности хранения. При хранении муки с влажностью выше стандартной (14-15%) происходит размножение микробов, что приводит к комкованию, слеживанию продукта. При более активном развитии микрофлоры возникают различные пороки муки - плесневение, прогоркание, прокисание.

Наиболее опасными среди бацилл являются разновидности *Bacillus Subtilis*, которые попадают в муку при помолу зерна, подвергнувшегося (самосогреванию). Вегетативные клетки гнилостных бацилл погибают при  $t = 98-100^{\circ}$ , которая создается в мякише при выпечке хлеба.

Однако, термоустойчивые споры бацилл переносят нагревание до  $120^{\circ}\text{C}$ . Сохраняясь в хлебе они при недостаточном охлаждении и задержке реализации развиваются в мякише пшеничного хлеба, разлагают белки и крахмал, образуют слизистые вещества – декстрины. В результате мякиш хлеба приобретает гнилостный запах и тягучую консистенцию. Гнилостные бациллы составляют специфическую микрофлору муки. Поэтому в практике хлебопечения каждую партию муки проверяют на наличие спор указанных бацилл. На основании полученных результатов дается оценка качества муки по микробиологическому показателю – количество спор бацилл в 1 г. муки.

При наличии в 1 г. муки до 200 спор-мука считается нормальной От 200 до 1000 спор – мука сомнительная От 1000 спор и более - мука сильно заражена с п о р а м и не должна использоваться для выпечки крупно-штучных изделий (буханок, батонов и пр.)

Такая мука может быть использована для мелкоштучных изделий с низкой влажностью (сухари, баранки, сушки и пр.)

## Задание

1. Провести описанным выше способом (раб.6) посев смыва с свежееубранного (или текущего года уборки) зерна пшеницы на МПА и агар Чапека, для учета количества колоний бактерий и грибов.

2. Подобным образом провести посев смыва зерна пшеницы, ранившегося в течение не менее 2-3 лет. Сравнить количественный и групповой состав микрофлоры.

3. Выбрать 2-3 наиболее характерные колонии бактерий и грибов. Описать их (см. выше). Сделать препараты для микроскопирования. Для бактерий – фиксированные препараты, окрашенные фуксином. Для грибов препараты в раздавленной капле, смотреть с объективами 8х и 40х. Зарисовать. На основании описания и микроскопирования преобладающей микрофлоры сделать ориентировочную оценку качества зерна.

4. Провести посев смыва с муки для определения в ней общего количества микроорганизмов.

5. Провести посев муки для определения в ней количества спор гнилостных бацилл, типа *Bacillus Subtilis*. Для этой цели следует приготовить суспензию навески муки в 100 мл. стерильной воды (см. выше). Полученную суспензию пастеризовать на водяной бане при 80°C в течении 10 минут (для уничтожения вегетативных клеток бактерий, а также дрожжей и грибов). Из прогретого образца сделать посева на МПА, поместить чашки в термостат с  $t = 30-35^{\circ}\text{C}$ .



Выросшие колонии подсчитать и сделать пересчет на 1 г муки. Дать оценку качества муки. Колонии описать, приготовить из них фиксированные препараты с окрашиванием фуксином, микроскопировать с иммерсией. Зарисовать.

### **Микрофлора молока, молочных продуктов и методы ее определения**

Молоко по своей питательной ценности представляет идеальный продукт для живых организмов в т.ч. микроорганизмов. Молоко в вымени здоровой коровы практически стерильно. рН свежего молока - 6,8. Однако, сразу после дойки молоко в той или иной степени загрязняется микрофлорой из внешней среды: шерсти животного, корма, доильного оборудования и т.д.

В молоке, полученном при соблюдении санитарных правил преобладают микрококки, в небольшом числе содержатся молочнокислые стрептококки, сарцины и др.

Загрязненное молоко может содержать значительное количество бактерий группы кишечной палочки, молочнокислых, масляно-кислых и гнилостных бактерий. Во время последующего хранения молока изменяется количество содержащихся в нем бактерий и соотношение между отдельными видами. Характер этих изменений зависит от температуры, продолжительности хранения и состава микрофлоры при получении. Следует отметить несколько фраз:

Бактерицидная фаза: сразу после дойки число бактерий в молоке не возрастает и даже иногда снижается. Это объясняется тем, что в свежесвыдоенном молоке содержатся бактерицидные вещества – лактенины, лизоцим и др. способные подавлять развитие бактерий.

Продолжительность бактерицидной фазы зависит от количественной обсемененности молока микрофлорой и температуры его хранения. Установлено, что чем быстрее молоко охлаждают после дойки, тем более продолжительной становится его бактерицидная фаза. Например, если в молоке с  $t^{\circ} - 35^{\circ}\text{C}$  (парное) бактерицидная фаза продолжается всего до 3 час., то при охлаждении молока до  $5^{\circ}\text{C}$  бактерицидная фаза достигает 36 часов. Чтобы продлить бактерицидную фазу рекомендуется возможно скорее охладить молоко по крайней мере до  $10^{\circ}\text{C}$ .

По окончании бактерицидной фазы наступает фаза смешанной микрофлоры. При этом развивается все микроорганизмы, попавшие в молоко. Но постепенно начинают преобладать молочнокислые бактерии. В конце фазы отмечается повышение кислотности молока и наступает фаза молочнокислых бактерий. В этой фазе молочнокислые бактерии быстро развиваются и подавляют другие микроорганизмы. Молоко при этом сквашивается.

Разные виды молочнокислых бактерий образуют разное количество молочной кислоты, что объясняется их неодинаковой кислотоустойчивостью. Более устойчивы гомоферментативные палочковидные бактерии, они образуют до 2 - 3,5% молочной кислоты, в то время как молочнокислые стрептококки лишь до 1%. По отношению к температуре молочнокислые можно разделить на мезофильные с оптимум роста при  $25-35^{\circ}\text{C}$  и термофильные – оптимум  $40-45^{\circ}\text{C}$ . Разные виды молочнокислых бактерий представлены на рис. 18.

При дальнейшем хранении молока с увеличением концентрации молочной кислоты подавляется развитие самих молочнокислых бактерий, число их начинает снижаться. В первую очередь отмирают молочнокислые стрептококки (*Streptococcus lactis*, *Str. cremoris*). Молочнокислые палочки более устойчивы к кислотности среды и отмирают медленнее. В конце концов на сквашенном молоке создаются условия для развития ложных дрожжей и

плесневых грибов. Рост бактерий подавляется. В результате развития грибов *Oidium lactis*, видов *Penicillium* и др. кислотность молока снижается, вследствие потребления ими молочной кислоты.

В результате создаются благоприятные условия для развития гнилостных бактерий, которые ускоряют процесс распада белков молока, что приводит продукт к окончательной порче.

В молоке сохраняемом при  $t^{\circ}$  ниже  $10-8^{\circ}\text{C}$  молочнокислые почти не размножаются, что способствует развитию холодостойких бактерий рода *Pseudomonas* или масляно-кислых клостридий, вызывающих прогоркание продукта.

В зависимости от задач, поставленных перед лабораторией, анализ молока на микрофлору проводят с большей или меньшей детальностью. Для тех случаев, когда надо быстро дать заключение потребителю о качестве молока или при массовом контрольном обследовании (анализ молока, сдаваемого поставщиками на рынок или на завод для переработки) приемлемы приблизительные методы определения бактерицидной чистоты и свежести молока, наиболее быстрые и легкие в исполнении – определение кислотности молока титрованием по Тернеру, метод редуктазной пробы, а также непосредственный подсчет общего количества микроорганизмов в 1 мл. молока Учетной камере под микроскопом.

В настоящее время в соответствии с требованиями Сан Пин (1997 г.) в молоке и молочных продуктах определяют следующие микробиологические показатели: КМАФАнМ (количество мезофильных аэробных и факультативно-аэробных микроорганизмов); БГКП (бактерии группы кишечной палочки); КПС (коагулязоположительный стафилококк).

Каждую группу определяют по соответствующей методике КМАФАнМ - методом посева и учета бактерий на МПА с мелом (для выявления молочно-кислых бактерий к основной среде добавляют 2-3% мела).

Метод выявления БГКП в молоке и молочных продуктах основан на способности бактерий кишечной группы сбраживать лактозу в среде Кеслера (см. приложение) с образованием кислоты и газа. По 1 мл. пастеризованного молока засеивают в пробирки с 5мл среды Кеслера и помещают в термостат при 37 С на 24 часа. После чего пробирки просматривают и по наличию в них газообразования предположительно судят о присутствии БГКП. Для идентификации из пробирок, в которых наблюдается брожение проводят посев на диагностическую плотную среду Эндо. Из каждой пробирки с признаками роста делают пересев петлей на поверхность плотной среды. Одну чашку можно использовать для высева одновременно 3х пробирок, разделив дно чашки карандашом на секторы. Посевы на плотных среда проводят таким образом, чтобы получить рост изолированных колоний. Посевы выдерживают в термостате при 37°С в течении 24 часов, после чего просматривают и отмечают рост колоний характерных для группы БГКП - на среде Эндо колонии плоские или слегка выпуклые или с валиком, бесцветные или красные с различной интенсивностью окраски, с металлическим или без металлического блеска. Из подозрительных колоний делают фиксированные препараты, окрашивают по Граму и микроскопируют с иммерсией. При обнаружении грамотрицательных палочек считают, что в продукте присутствуют БГКП. Результат записывают как «обнаружены (не обнаружены) БГКП в анализируемой массе продукта».

При обнаружении бесцветных колоний на чашках со средой Эндо в условиях работы лабораторий, расположенных на территории молочных предприятий, во избежание пропуска патогенных бактерий семейства кишечных палочек, указанные чашки должны передаваться лаборатории СЭС для дальнейшего изучения.

Для определения присутствия в молоке и продуктах (например сухом молоке) коагулязоположительных (гемолитических) стафилококков делают посев исследуемого продукта обычным способом (раб.6) (с разведением не более 1:10) на диагностические среды: мелочно-солевой агар, или желточно-солевой агар, или МПА с 5-10% дефибринированной крови (бычьей, кроликов и др.). Посевы выращивают в термостате при 37°C в течение 24-28 часов. После 48 часов колонии подсчитывают и делают пересчет на 1 г. или 1 мл. исследуемого продукта. Затем проводят изучение и описание внешнего вида колоний. Колонии, характерные для *Staphylococcus aureus* на молочно (желточно) солевом агаре выглядят как довольно крупные (2-4 мм в диаметре), плоские, блестящие, окруженные радужной зоной, окрашенные от белого до лимонно-желтого и оранжевого цветов. Фиксированные препараты, приготовленные из колоний окрашивают по Граму и микроскопируют с иммерсией. Стафилококки окрашиваются по Граму положительно (грам +), клетки имеют шарообразную форму и располагаются скоплениями (гроздьями). При выявлении стафилококков в определенной массе (объеме) продукта результаты записывают как «обнаружены (не обнаружены) стафилококки типа *Staphylococcus aureus* в анализируемой массе продукта».



*Lactobacillus bulgaricum* после культивирования при 40 С в молоке: а) стерильном; б) пастеризованном при 80 С. препараты окрашены метиленовой синью.



Колонии *Str. Lactis* на агаре с мелом. Видны зоны растворения мела вокруг колоний.

*Streptococcus Lactis* – молочнокислый стрептококк в мазке из кислого молока.

*Streptococcus cremoris*. Длинные цепочки. Молоко.

*Lactobac plantarum*. Короткие палочки, расположенные цепочками. Сусло.

*Lactobac breve*. Короткие палочки с закругленными концами. Рис. 18. Молочнокислые бактерии (*Lactobacillus*).

### Задание

1. Определить общее количество микроорганизмов, в т.ч. молочнокислых бактерий в пастеризованном и сухом молоке, путем непосредственного посева продукта (для сухого молока посев смыва) на плотную среду МПА с мелом.

2. Сделать посев в пробирки (или колбочки) с жидкой средой Кесслера образцов пастеризованного молока, сухого молока, творога для выявления БГКП.

В случае обнаружения в пробирках и колбах признаков брожения – сделать пересев на среду Эндо. Из выросших колоний сделать препараты, окрасить по Граму. Смотреть с иммерсией, сделать заключение.

3. Для выявления КПС в молочных продуктах сделать посевы образцов – пастеризованного и сухого молока, сухих сливок на молочно (желточный) солевой агар или агар с кровью. Выращивать при  $t = 37^{\circ}\text{C}$  в течение 48 часов. Из выросших колоний сделать фиксированные препараты, окрасить фуксином и по Граму. Смотреть с иммерсией. Зарисовать.

4. Сделать фиксированные препараты непосредственно из разных видов молочнокислых продуктов - кефира, йогурта, ацидофилина, продуктов, изготовленных с применением бифидобактерий. Покрасить метиленовой синью. Смотреть с объективом 40х или с иммерсией. Зарисовать.

### **Микрофлора сливочного масла и маргарина**

Микрофлора масла зависит, главным образом, от микрофлоры молока и состоит в основном из молочнокислых бактерий. Количество бактерий в масле приготовленном из свежих сливок или сметаны может достигать миллионов в 1 г. продукта. Другие виды бактерий могут попадать в масло с аппаратуры, воздуха, воды и пр.

Известно, что бактерии могут развиваться только в плазме масла. Плазма - это водный раствор белков, молочного сахара и солей, плазма распространена в масле в виде капелек разной величины. Масло, выработанное поточным методом имеет более гомогенную консистенцию и в меньшей степени является благоприятной средой для развития бактерий, по сравнению с маслом, полученным сбивным способом. Хранение масла при недостаточно низких температурах ухудшает его качество в основном в результате развития в нем микробиологических процессов. Поэтому для характеристики качества масла имеет значение общее количество в нем бактерий (КМАФАнМ), в т.ч. гнилостных и жирорасщепляющих видов, развитие которых приводит к пептонизации и глубокому распаду белка и жира с образованием гнилостного сырного запаха и горького вкуса.

Прогоркание масле вызывают также многие виды плесневых грибов в т.ч. *Oidium lactis*, *Penicillium glaucum*, реже грибы из рода *Cladosporium*, *Alternaria* и др.



Грибы обычно развиваются на поверхности масла, но некоторые виды (*Cladosporium*) способны расти в пустотах плохо спрессованного масла. Грибы образуют на поверхности и в пустотах черные и цветные налеты, расщепляют белок и жир, что проявляется в виде разных пороков масла - осаливании, прогоркании, появлении гнилостного и других неприятных запахов.

Маргарин - это продукт получаемый путем смешивания растительных масел, животных жиров, сквашенного и свежего молока или воды. В качестве улучшителей консистенции, вкуса и аромата добавляют соль, сахар, сливочное масло, красители, витамины и др.

Для получения сквашенного молока применяют специальные закваски, представляющие собой смесь чистых культур гомо и гетероферментативных молочнокислых бактерий (*Streptococcus lactis*, *Str. cremoris*, *Str. citrovoms*). Заквашенное молоко увеличивает стойкость маргарина при хранении. Помимо молочнокислой микрофлоры, в маргарине содержатся другие микроорганизмы, попадающие из сырья, воды, воздуха, оборудования и пр. наиболее опасными возбудителями порчи могут быть спорообразующие гнилостные бактерии типа *Bacillus subtilis*. Они разлагают белки, входящие в плазму маргарина, что придает продукту гнилостный запах и горький вкус. Беспоро-вые бактерии рода *Pseudomonas* расщепляют жиры с образованием продуктов распада, придающих маргарину прогорклый вкус. Плесневые грибы также разлагают жиры, изменяют вкус, запах, а иногда и цвет готового продукта. В 1 г. маргарина при нормальных условиях хранения может быть от нескольких десятков до сотен тысяч и более микроорганизмов.

Низкие температуры хранения и заквашивание предотвращают размножение вредной микрофлоры. Однако при нарушении условий хранения количество микробов значительно возрастает, главным образом за счет

размножения психрофильных видов, гнилостных и флюоресцирующих бактерий, а также плесневых грибов.

### **Задание**

1. Провести посев масла или маргарина на плотную среду МПА с мелом для учета общего количества микроорганизмов и выявления кислотообразующих бактерий.

Для проведения посева навеску продукта вносят в колбу со 100 мл. стерильной водопроводной воды, предварительно нагретой до  $t^{\circ} = 45^{\circ}\text{C}$ . После тщательного перемешивания из разведения 1:100 сделать посев 1 мл. на чашку и залить указанной средой.

2. Сделать посев на сусловой агар для выявления и учета грибов.

### **Микрофлора мяса и методы ее определения**

Мясо относится к числу важнейших пищевых продуктов. В тоже время высокое содержание в сыром мясе воды (до 75%) и белковых веществ (20%) делает мясо хорошим питательным субстратом для микроорганизмов, особенно для гнилостных бактерий. Мясо здоровых убойных животных стерильно. Только в тканях больных животных, утомленных перед убоем животных могут быть обнаружены некоторые виды бактерий. Большое их количество попадает на мясо во время убоя и обработки, особенно, когда при разделке туш повреждается кишечник. В том или ином количестве микроорганизмы попадают на мясо с шерсти и кожи животного, с инструментов, которыми пользуются при разделке туш, из воздуха и т.д.

Групповой и видовой состав сырого мяса имеет разнородный характер. Наиболее часто обнаруживаются представители группы КМАФАнМ - *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, некоторые виды гнилостных бацилл, молочнокислые, а также БГКП и другие.

При благоприятных условиях бактерии быстро размножаются, постепенно проникают в толщу мяса, вызывая его порчу. Скорость процессов порчи мяса зависит от температуры и влажности окружающего воздуха, а также от степени обсемененности его микрофлорой.

Наиболее часто порча мяса проявляется в виде гниения и ослизнения, иногда в виде кислотного брожения и плесневения .

Гниение мяса обычно происходит при  $t^{\circ}$  выше  $10^{\circ}\text{C}$  (оптимальная температура  $25-30^{\circ}\text{C}$ ) и вызывается гнилостными аэробными и анаэробными бактериями. Среди аэробов наиболее распространены *Bacterium proteus*, *Pseudomonas*, гнилостные бациллы типа *Bac.subtilis*, среди анаэробов *Clostridium sporogenes*.

В начальной стадии гниение развивается под действием аэробных бактерий, по мере углубления процесса все большую роль приобретают анаэробы. Мясо при этом изменяет цвет, становится серо-зеленым, ослизняется и размягчается. Гниение сопровождается выделением отвратительного запаха. Наряду с распадом белковых веществ происходит глубокое расщепление жира, в результате мясо приходит в полную негодность.

Ослизнение мяса может проходить в условиях повышенной влажности при  $t^{\circ}$  от 2 до  $10^{\circ}\text{C}$ , что способствует развитию слизиобразующих, холодоустойчивых, аэробных бесспорных бактерий *Achromobacter*, *Pseudomonas* др. Для предупреждения ослизнения охлажденное мясо следует хранить при  $t^{\circ}$  от  $0^{\circ}$  до  $-2^{\circ}\text{C}$  при влажности воздуха 85 -90%.

Кислотное брожение мяса проявляется в появлении неприятного кислого запаха, изменении окраски до серой и размягчении продукта. В практике этот процесс иногда называют «Загаром». Возбудителями данного

вида порчи являются некоторые виды анаэробных клостриций. Наблюдается часто при плохом обескровливании туш, при недостаточно быстром охлаждении и плохой вентиляции при хранении парного мяса.

Плесневение мяса является следствием развития на его поверхности плесневых грибов, чаще всего видов *Penicillium* (зеленая плесень), *Rhizopus* (серая плесень), *Alternaria* и *Cladosporium* (черная плесень). Плесневение возникает при плохой вентиляции, повышенной влажности и относительно низкой температуре воздуха в камерах хранения. Циркуляции воздуха способствует подсыханию поверхности мяса и предупреждает развитие плесеней.

Наилучшими условиями для задержки роста микрофлоры и предотвращения порчи мяса являются быстрое охлаждение туш после убоя, поддержание в камерах хранения достаточно низкой температур и влажности порядка 85%.

По качеству или свежести мясо делят на три категории - свежее, сомнительной свежести и несвежее. Свежим считается мясо при условии, если количество МАФАНМ не превышает 100 тыс. ( $10^5$  КОЕ/г.) продукта.

Для определения свежести мяса кроме органолептической оценки проводят бактериоскопическое исследование, дающее возможность быстро определить степень обсемененности продукта микрофлорой и ориентировочно установить степень его качества. При бактериоскопическом исследовании делают препарат-отпечаток с поверхности мяса, путем прижимания к нему стерильного предметного стекла.

Полученные мазки подсушивают, фиксируют в пламени горелки и окрашивают фуксином, а также по Граму.

На основании бактериоскопического исследования устанавливают следующие признаки характеризующие качество мяса:

1. Свежее На отпечатках микроорганизмы не обнаруживают или видны единичные экземпляры кокков или палочек в поле зрения микроскопа. На стекле не заметно остатков разложившейся ткани мяса.
2. Сомнительной свежести На отпечатках несколько десятков кокков (20-30) или несколько палочек. Помимо микробов, явно заметны следы распада мышечной ткани.
3. Несвежее На отпечатках мяса преобладают бактерии в виде палочек - почти все поле зрения микроскопа усеяно ими. Большое количество распавшейся ткани мышц.

Обнаружение в препаратах окрашенных по Граму присутствия грам – палочек свидетельствует о содержании в продукте БГКП, протей и др. видов гнилостных бактерий. Типичные представители гнилостной микрофлоры мяса показаны на рис.19

### **Задание**

1. Определить свежесть мяса и натуральных полуфабрикатов бактериоскопическим методом.

2. Определить количество микроорганизмов на 1г. продукта в мясе замороженном и мясном фарше методом посева смыва на МПА (раб.6).

### **Микрофлора рыбы и рыбных продуктов**

Количественный и видовой состав естественной микрофлоры живой рыбы зависит от условий ее обитания, т.е. микробного населения толщи воды и донного ила, а также сезона и способа лова. Поверхность рыб покрыта слизью (гликопротеид – муцин, аминокислоты и др.). В слизи обнаруживаются в основном Грам - палочки, типа *Pseudomonas*, а также Грам + микрококки. При  $t^{\circ}$  воды 4-8 $^{\circ}$ C преобладают палочки, при  $t^{\circ}$  воды 14-25 $^{\circ}$ C - микрококки. Спорообразующие аэробные, анаэробные, БГКП для поверхностной микрофлоры нехарактерны, а иногда практически отсутствуют.

Стафилококки и стрептококки в мазках из чистой культуры. Колонии *Staphylococcus aureus* на кровяном агаре.

*Pseudomonas fluorescens*. Короткие палочки.  
*Escherichia coli*.

*Proteus vulgaris*. Длинные и короткие палочки.

Рис. 19. Палочковидные бактерии (кокки) не образующие спор.

Однако в кишечнике микрофлора более многочисленная и разнообразная. Химический состав рыбы (вода 50-80 % , белки 15-20 % , жир 0,1- 30 %) представляет исключительно благоприятную среду для развития разнообразных, и прежде всего гнилостных микроорганизмов. Рыба менее устойчива в хранении по сравнению с мясом. Мясо рыб более рыхлое, в составе жира преобладают жирные ненасыщенные кислоты и он легко окисляется. Мясо здоровых живых рыб практически стерильно. В период засыпания сопротивляемость тканей снижается (автолиз). Даже в условиях хранения при  $t^{\circ}=0^{\circ}\text{C}$  число микроорганизмов через 1-2 сут. резко возрастает. Прежде всего на поверхности кожи в слизи и жабрах. Большое значение для получения качественных рыбных продуктов имеет правильно организованная первичная обработка рыбы. При тщательной мойке число микроорганизмов снижается иногда на 80-90 % Потрошение вновь приводит к увеличению поверхностной обсемененности рыбы. Поэтому тщательная мойка после потрошения строго обязательна. Филетирование изменяет не только количественный но и качественный состав микрофлоры. При этом имеет важное значение общее санитарное состояние производства - чистота оборудования, инструментов и

т.д. Срок хранения охлажденной рыбы ограничен 10-12 дней, т.к. в течение этого срока заметно активизируется развитие психрофильных гнилостных бактерий (*Pseudomonas*). Более действенный процесс - замораживание проводится при  $-30$   $-35^{\circ}$  C, температура тела рыбы  $-18^{\circ}$ C. При такой температуре рыба может храниться длительные сроки. Следует учитывать, что многие виды микроорганизмов при замораживании сохраняют свою способность и при размораживании начинают быстро размножаться.

Имеются данные о способности размножения некоторых видов бактерий при  $t^{\circ}$  от  $-2^{\circ}$  до  $-7^{\circ}$ C. Наиболее устойчивы при замораживании споры бацилл, микрококки, галофильные бактерии, плесневые грибы. Чем больше было микроорганизмов в рыбе перед замораживанием, тем больше их останется после. Следовательно нужно замораживать рыбу сразу после вылова. Замораживание не разрушает уже образовавшихся токсинов.

### ***Соленая рыба***

По отношению к соли микроорганизмы подразделяются на три группы:

1. Галофобы - солечувствительные. Группа включает большинство патогенных и гнилостных видов (концентрация NaCl не выше 6%).

2. Факультативные галофилы или солеустойчивая группа – бациллы, клостридии, кокки, дрожжи плесени. Типичный представитель *Staphylococcus aureus*, хорошо развивается в средах содержащих от 8 до 12 % соли.

3. Облигатные галофилы - солелюбивые. Не растут в отсутствии соли.

Необходимо не менее 12 % NaCl. Типовой вид *Halobacterium Solinarium*.

Выживаемость микроорганизмов в соли (тузлуках) при посоле рыбы зависит от многих факторов:  $t^{\circ}$ , pH, обсемененности микрофлорой самой соли, ее концентрации и др. В самосадочной соли часто присутствуют т.н. красные галофилы, которые развиваются на соленой рыбе при сухом посоле, вызывают порок под названием «фуксин» - красный слизистый налет, издающий резкий неприятный запах. Очевидно необходим микробиологический контроль соли на



галофилы. (Посев соли на МПА с содержанием 20% соли). По мере хранения соленой рыбы меняется состав ее микрофлоры, снижается ее общее количество, сохраняются солеустойчивые и галофильные виды (микрококки, бациллы). Появляются также некоторые виды молочнокислых бактерий (в сельди). Консервирующее действие соли при посоле рыбы можно усилить добавлением бензойной или сорбиновой кислот.

Основную консервирующую роль в технологии приготовления копченой рыбы играет фракция фенолов и органических кислот коптильного дыма. Эта фракция образует уксусную, салициловую, бензойную кислоты, но особенно формальдегидную - вещества, которые обладают активными антимикробным действием. Действие фенолов и органических кислот возрастает при повышении температуры, поэтому эффект больший при горячем копчении. Однако рыба горячего копчения менее стойка при дальнейшем хранении по сравнению с рыбой холодного копчения, т.к. она содержит больше влаги и меньше соли. Важное значение при хранении имеет вид упаковки. Установлено, что наиболее хорошо хранилась копченая рыба в полиэтиленовых пакетах с вакуум-упаковкой.

### **Задание**

1. Определить количество микроорганизмов на 1г. продукта в рыбе замороженной, засоленной, горячего копчения. Методом посева смыва на МПА.

2. Приготовить фиксированные препараты из выросших на агаре наиболее характерных колоний.

Смотреть с иммерсией. Зарисовать.

## **Микрофлора сахара и методы ее определения**

В сахарный песок микроорганизмы попадают при отбелке, сушке, упаковке и хранении.

Наиболее легко инфицируется сахар с повышенной влажностью. При влажности сахара не более 0,15% (стандарт) микроорганизмы сохраняют жизнеспособность, но не развиваются. В тоже время было установлено, что если при влажности 0,15% в 1г. сахара насчитывали в среднем 50 шт. бактерий. То при влажности до 1,3% их количество возрастало до 10 000 в 1г.

В сахаре встречаются мезофильные и термофильные бактерии, аэробные и анаэробные. Среди них имеются газообразующие и кислотообразующие. Среди термофилов преобладают бациллы с чрезвычайно термоустойчивыми спорами. В сахарном песке встречаются также дрожжи и плесневые грибы, главным образом виды родов *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*.

Сахар, избыточно обсемененный микроорганизмами, может быть причиной порчи кондитерских изделий, например вафель, шоколадных начинок, рулетов и др. сахар является одним из основных источников внесения термофильной микрофлоры при изготовлении консервов. Известны несколько видов порчи, обусловленной развитием термофилов, сохранившихся в консервах (зеленом горошке, пюреобразных консервах для детского питания и др.) в виде остаточной микрофлоры после стерилизации.

1. Плоскокислая порча, типичный возбудитель *Bacillus stearothermophilus*. Эти бактерии при усвоении углеводов образуют не газ, а кислоты - уксусную, муравьиную и др. продукты приобретают кислый вкус.

2. Бомбашная порча. Возбудитель - анаэробный термофил - *Clostridium thermosaccharolyticum*. В результате жизнедеятельности этих клостридий образуется  $\text{CO}_2$  и водород, банки вздуваются.

Существуют нормы допустимого количества термофилов в сахаре, используемом в консервной промышленности:

Всего спор термофилов не  $> 125$  в 10г. сахара.

Спор возбудителей плоского скисания не  $> 50$  в 10г. сахара

### Задание

1. Определить общее количество мезофильных, в т.ч. слизиобразующих бактерий в 1г. сахара-песка.

Для этого навеску сахара 20г. в 100мл стерильной водопроводной воды встряхивать до полного растворения сахара после чего провести посев по 2 мл в 5 чаше на МПА для учета общего количества микроорганизмов и в 5 чашек на сахарный агар (МПА + 10% сахароза) для учета слизиобразующих видов. Посевы выращивают в термостате при  $t = 30^\circ$  с течение 48-72 часов.

После чего определяют общее количество мезофильных бактерий на МПА и число слизиобразующих, путем подсчета слизистых каплеподобных колоний на сахарном агаре. Сделать препараты, покрасить, посмотреть с иммерсией.

2. определить общее количество спор термофильных аэробов и отдельно число спор, возбудителей плоского скисания в 10г. сахара.

Для этой цели приготовить раствор сахара в 100мл стерильной воды (см.п.1) колбу с раствором сахара выдержать в кипящей водяной бане в течение 5 мин. охладить раствор. Провести посев по 2 мл в 5 чашек и залить их глюкозо-петонной средой следующего состава: пептон 10 г., глюкоза 5г., агар 15г., бромкрезол пурпур (индикатор) 0,04г, вода 100 мл.

Посевы выращивать в термостате при  $t = 55^{\circ} - 60^{\circ}\text{C}$  в течение 48 часов. После чего подсчитать общее количество колоний термофилов на глюкозопептонном агаре с индикатором и число колоний, возбудителей плоского скисания, вокруг которых на фиолетовом или пурпурном фоне среды образуется желтый ореол, вследствие взаимодействия образующейся кислоты с индикатором.

Т.к. на 5 чашек было высеяно 2г.сахара, то чтобы получить общее число спор аэробных термофилов в 10г., общее число подсчитанных колоний умножают на 5. Для получения числа спор возбудителей плоско кислой порчи в 10г.сахара - число колоний с желтым ореолом также умножают на 5.

Выбрать 2-3 преобладающие колонии, описать их и приготовить препараты для микроскопирования. На основании полученных данных дать оценку качества сахара.

### **Микрофлора солода и ее определение**

Солод является основным источником нежелательной микрофлоры в бродильном производстве. В период замачивания и проращивания зерна микроорганизмы быстро размножаются на его поверхности. В 1г. солода за короткое время общее число микроорганизмов возрастает в 10-20 раз по сравнению с исходным сырьем. Микрофлора солода представлена бактериями, дрожжами и плесневыми грибами.

Среди бактерий преобладают молочнокислые, как гомоферментативные – *Zctobacillus delbrueckii*, *Zactobacillus plantarune*, так и гетероферментативные – *Zeusconostoc* и др. Попадая в готовый продукт

(пиво) молочнокислые бактерии вызывают его помутнение, изменяют запах и цвет, а также способствуют закисанию сусла и пива.

Уксуснокислые бактерии инактивируют амилазу солода, образуют пленки на поверхности пива и вызывают его прокисание. Наиболее нежелательным для пивоварения является присутствие в солоде большого количества сарцин (пе-диококков). Они образуют муть, осадок и ослизнение сусла и пива, придают ему неприятные запах и вкус. Вредное действие на качество пива могут также оказывать некоторые виды дрожжей, в т.ч. несахйромицеты *Candida Eorulopsis*. *Candida mycoderma* развивается на поверхности сусла и пива в виде белой или сероватой пленки и придает пиву неприятные запах и вкус. *Forulopsis albus* (пивная торула) вызывает помутнение и ухудшение вкуса.

Из плесневых грибов в солоде часто встречаются *Penicillium glaucum*, *Asper gillus niger*, *Oidium lactis* (молочная плесень) и *Rhizopus*. Особо опасными для солода являются грибы *Penicillium* и *Rhizopus*. Они убивают зародыш зерна, при этом солод темнеет, резко снижаются его ферментативные свойства.

### **Задание**

1. Определить общее количество микроорганизмов в 1г. солода путем посева его на МПА, МПА с мелом и сусло-агар(СА). Провести подсчет и качественный анализ выросших колоний, описать их, приготовить препараты – для бактерий фиксированные, окрашенные фуксином, для дрожжей в капле воды с окраской метиленовой синей, для грибов в раздавленной капле. Смотреть с соответствующими объективами (90х, 40х и 8х).

## **Микрофлора свежих плодов и овощей**

По химическому составу плоды и овощи (сочные растительное сырье) представляет собой весьма благоприятную среду для развития самых разных микроорганизмов: бактерий, мицелиальных грибов, дрожжей.

На поверхности неповрежденных свежих плодов и овощей при уборке всегда находится значительное количество микроорганизмов, многие из которых не принимают участие в их порче. Их называют эпифитными. Число эпифитов и их видовой состав колеблется в зависимости от вида плодов и овощей, почвенных, климатических, погодных условий и т.д.

На поверхности корнеплодов и других овощей преобладает самая разнообразная почвенная микрофлора: бациллы, клостридии, актиномицеты. На плодах преобладают уксуснокислые, молочнокислые бактерии, всевозможные виды дрожжей из числа сахаро- и несакхаромицетов. На поврежденных при механической уборке перезрелых, размягченных, вследствие длительного хранения или при неблагоприятных условиях, плодах число эпифитов сначала возрастает и появляются специфические виды - возбудители различных типов порчи. Болезни плодов и овощей в практике носят название «гнили».

Многие плоды и овощи образуют специфичные антимикробные вещества, препятствующие до определенной степени развитию тех или иных возбудителей: фитонциды, алкалоиды, глюкозиды, эфирные масла, органические кислоты и т.д. Например, лук и чеснок образуют аллицин - сернистые соединения с резким специфическим запахом. Хрен - синигрин, горчица - те же примерно вещества. Морковь содержит бензойную кислоту. Перец - капсаицин, клюква, брусника - салициловую кислоту, рябину - сорбиновую кислоту, которые являются природными консервантами. «Гнили»

бывают сухие и мокрые. При мокрой гнили происходит быстрое разложение растительной ткани с размягчением и увлажнением мякоти плодов. При сухой - ткань сморщивается, высыхает или превращается в порошок. Преобладание грибов в числе возбудителей «гнилей» объясняется высоким содержанием углеводов и небольшим количеством белков, а также высокой кислотностью плодов, ягод и некоторых овощей (томаты). У овощей содержащих больше белков (картофель, морковь), а также имеющих в основном нейтральную реакцию среды, чаще встречается бактериальная порча. Иногда порча плодов и ягод вызывается дрожжами. Интенсивность развития болезней на плодах, овощах зависит от многих условий: сортовых особенностей, исходного качества сырья при закладке на хранение, активности возбудитель, температуры и влажности воздуха в хранилище и др. Лежкоспособность овощей и плодов обеспечивается своевременностью уборки и отсутствием механических повреждений. В первую очередь при хранении портятся незрелые, перезрелые, а также поврежденные плоды и овощи. Наиболее благоприятна температура хранения в пределах 1-3°C.

## **БОЛЕЗНИ КАРТОФЕЛЯ**

**Фитофтора (*Phytophthora infestans*)** - класс оомицеты. При заболевании поражаются листья, стебли и клубни. Появляется во второй половине лета после цветения картофеля. С надземных частей растения споры с дождевой водой проникают в почву и заражают клубни. Но большей частью клубни заражаются в период уборки картофеля при соприкосновении их с зараженной ботвой. На клубнях болезнь проявляется в виде буроватых, слегка вдавленных твердых пятен. Побурение ткани начинается с наружных слоев клубня, постепенно распространяется внутрь его и может охватить весь клубень. (Рис.2)

При нормальных условиях хранения инфекция от больных клубней к здоровым не передается. Главная опасность фитофторы состоит в том, что она в сильной степени предрасполагает клубни к заражению другими гнилями - фузариозами и мокрой гнилью, поэтому во вторую половину зимнего хранения фитофтора на клубнях мало заметна, она часто маскируется сухой гнилью (фузароз).

Фитофтора поражает и другие пасленовые культуры, в т.ч. томаты и перец.

Фузариоз или сухая гниль вызывается некоторыми видами грибов рода *Fusarium*. На зараженном клубне появляются бурые пятна, покрытые на поверхности небольшими светлоокрашенными подушечками, которые представляют собой мицелий гриба с конидиеносцами. По мере развития заболевания клубни буреют и сморщиваются, внутри них образуются пустоты.

Фузариоз развивается, главным образом, во второй половине периода хранения, заражаются преимущественно клубни поврежденные или зараженные фитофторой. При благоприятных условиях (особенно при повышенной влажности воздуха) болезнь передается от больных клубней здоровым.

Мокрая гниль. Вызывается некоторыми видами бактерий живущими в почве. Попаданию бактерий в клубни способствует повышенная влажность почвы, а также повреждения клубней. На зараженном клубне появляются бурые или черные мокнущие пятна, ткань размягчается и клубень в конце концов может превратиться в слизистую кашицеобразную массу с неприятным запахом. Особенно часто мокрой гнилью поражаются клубни, поврежденные фитофторой, а также подмороженные, хранимые при высокой влажности



воздуха. Эта гниль распространяется обычно гнездами, т.к. передается при непосредственном соприкосновении клубней.

## **ГНИЛИ ОВОЩЕЙ**

### **Белая гниль моркови и других овощей.**

Возбудителем белой гнили моркови, а также бахчевых культур, огурцов, капусты и др. является гриб склеротиния (*Sclerotinia libertiana*) - класс аскомицетов. Мицелий гриба внедряется в ткани овощей, образуя на их поверхности белые пушистые налеты. Пораженная ткань быстро размягчается и распадается. Позже на грибнице образуются относительно крупные черные склероции, которые опадают и могут сохраняться в овощехранилище длительное время. При прорастании склероциев на них образуется огромное количество спор, с помощью которых заражаются все новые партии овощей.

### **Черная сухая гниль моркови.**

Возбудитель болезни *Alternaria radicina* относится к классу несовершенных грибов. На корнеплодах появляются сухие черные вдавленные пятна. Гниль чаще начинается с верхушки, иногда сбоку. Пораженная ткань чернеет и покрывается пушистым налетом. Болезнь заносится в хранилище с зараженными корнеплодами.

**Мокрая бактериальная гниль моркови.** Вызывается некоторыми видами бактерий, особенно часто *Bacterium carotovorum*. Гниль обычно начинается с кончика корня моркови. Пораженная ткань размягчается и быстро превращается в слизистую кашицеобразную массу с неприятным запахом. Постоянным источником инфекции является почва, с частицами которой бактерии заносятся в хранилище.

**Серая гниль капусты** – наиболее распространенный вид заболевания свежей капусты. Вызывается грибом *Botrytis cinerea*, относящимся к классу дейтеромицетов. Загнившие кочаны с поверхности покрываются серым пушистым налетом - мицелием гриба. Верхние листья ослизняются и буреют. Болезнь быстро распространяется в хранилище с помощью образовавшихся в огромном количестве конидий гриба. Паразит заносится в хранилище с пораженными овощами или сохраняется в остатках урожая.

### **Шейковая серая гниль лука.**

Вызывается грибом вида *Botrytis allii*. Гниль обнаруживается на луке недели через две после уборки. Гниль начинается обычно с низкообрезанной шейки. Наружные чешуйки сморщиваются, а внутренние загнивают и покрываются серой плесенью с черными склероциями. Ткань луковицы размягчается, становится водянистой, как бы вареной.

Наиболее благоприятные условия заражения создаются в период уборки лука, когда обрезают листья. Проникая в пораженную ткань шейки, паразит достигает затем и луковицы. Особенно сильно поражается недозревший лук с толстой мясистой шейкой. Сырая погода во время уборки и недостаточная просушка луковиц способствуют массовому заражению. Распространяется болезнь, главным образом, с посадочным материалом, кроме того, источником болезней могут служить и зараженные растительные остатки, сохранившиеся в почве.

## **Болезни плодов и ягод**

Известно, что возбудители порчи плодов, ягод как в процессе созревания, так и при хранении в большинстве случаев являются разные виды грибов.

**Плодовая гниль** яблок, груш, а также косточковых плодов (*Monilia fructigena*) – широко распространенное опасное заболевание. большей частью инфекция попадает в плоды еще в саду в результате проникновения вредителей и механических повреждений. Появляющееся на месте повреждения небольшое бурое пятно, постепенно разрастаясь, охватывает весь плод. Мякоть плода буреет, размягчается и становится губчатой. Позднее на поверхности плода образуются серовато-бурые порошащиеся подушечки (бородавки), располагающиеся концентрическими кругами (конидиальное спороношение). При повышенной температуре и влажности болезнь развивается очень быстро, при пониженной (0-5°C) пораженные плоды обычно чернеют, твердеют, поверхность их становится блестящей, как бы лакированной, плоды превращаются в склероции («мумии»). Часть сморщенных мумифицированных плодов остается висеть на деревьях, часть зимует с опавшей листвой. Такие плоды служат в дальнейшем источником инфекции.

**Голубая и сизая плесень (гниль).** Возбудитель *Penicillium expansum*.

Поражает плоды во время хранения. Инфекция проникает в местах повреждения кожицы. Мякоть плода становится водянистой, приобретает плесенный запах. Буроватая поверхность плода сморщивается и покрывается конидиями в виде мелких подушечек голубовато-серого цвета. Потери иногда достигают до 80%. Плоды приобретают токсичность – патулин.

**Горькая гниль.** Возбудители: *Gloeosporium album* и *Colletotrichum fructigenum*. Поражают плоды еще в саду. На плодах образуются резко очерченные бурые углубленные пятна с бледно-розовыми точками (подушечки с конидиями). Мякоть плода становится горькой. Первый из указанных видов грибов развивается более активно при более высоких температурах, второй – при пониженных. В холодильниках плоды поражаются горькой гнилью чаще во второй половине срока хранения.

## Болезни цитрусовых плодов

**Голубая плесень (*Penicillium italicum*).** Инфекция проникает чаще всего через механические повреждения кожицы в период уборки, транспортирования и хранения. При контакте с больными плодами заражаются здоровые, особенно перезревающие. В фазе спороношения поврежденные участки приобретают голубой цвет, кожица размягчается, мякоть становится горькой.

### **Черная гниль (*Alternaria citri*).**

Характерный признак – при хранении на кожице плода появляется небольшое темно-коричневое пятно с черной окраской в центре. Гниль постепенно проникает в мякоть. Мякоть темнеет и разрушается, иногда становится сухой и твердой.

Некоторые виды болезней овощей и плодов представлены на Рис. 20.

Фитофтора картофеля.

1 – пораженный лист; 2 – пораженный клубень; 3 – конидиальное спороношение паразита

Гнили корнеплодов моркови.

Фитофтора плода томатов.

1 – белая гниль; 2 – серая гниль; 3 –  
черная гниль.

Плодовая гниль (*Monilia fructigena*):

А – пораженное яблоко; Б – конидии и мицелий гриба в тканях яблока.

Шейковая гниль лука:

а – пораженная луковица; б – конидиекносец с конидиями гриба *Botrytis allii*.

Рис. 20. Виды болезней овощей и плодов.

## Задание

Используя имеющиеся в лаборатории учебные пособия: плакаты, муляжи, препараты, а также пораженные теми или иными заболеваниями клубни картофеля, корнеплоды, овощи и плоды ознакомиться с описанными выше болезнями картофеля, овощей и плодов при хранении.

Приготовить препараты на предметных стеклах с поврежденных фузариозом клубней картофеля; корнеплодов моркови, пораженных белой гнилью (склеротиния); капусты, пораженной серой гнилью; плодов яблок, пораженных в сильной степени плодовой гнилью и др. посмотреть под микроскопом с объективами  $\times 8$  и  $\times 40$ .

Сделать соответствующие рисунки.

## Микрофлора квашеных овощей

Молочнокислородное брожение при квашении плодов и овощей возникает спонтанно в результате деятельности молочнокислых бактерий, постоянно находящихся на растительном сырье. Чтобы они получили доступ к сахаристому соку в клетках овощей - капусту измельчают, пересыпают солью (2-3%), плотно укладывают в емкости и оставляют под гнетом. В начальной стадии брожения развиваются бактерии (молочнокислые, уксуснокислые), дрожжи и др. В капусте образуются кислоты,  $\text{CO}_2$ , спирт. Затем, благодаря  $\text{CO}_2$ , создаются ана-эробные условия для преимущественного развития молочнокислых бактерий. В первую очередь развиваются гетероферментативные бактерии - *Leucomostoc*, на смену им приходят палочковидные гомоферментативные - *Lactobacillus plantarum* и гетероферментативные *Lactobacillus brevis*, дрожжи. Скорость сквашивания капусты зависит от температуры. Оптимальная  $t^\circ$  - 20-25 $^\circ\text{C}$ , при которой брожение протекает обычно в течение 6-8 суток. Образующаяся молочная

кислота (1,5-2%) оказывает консервирующее действие, а вещества побочных реакций придают продукту характерные органолептические свойства.

После окончания брожения квашеную капусту следует хранить при температуре 0-3°C, чтобы задержать развитие посторонней микрофлоры - пленчатых дрожжей, плесеней, уксуснокислых, маслянокислых, гнилостных бактерий. Рекомендуется применение чистых культур молочнокислых бактерий в заква-сках.

### **Квашение огурцов (соление).**

Идет в две стадии: 1-я предварительная (1-2 дня) - соль 6-7% до накопления 0,3-0,4% кислоты при температуре 20-22°C, а затем медленная стадия при температуре от -1 до +2°C.

Вначале процесса начинают гетероферментативные *Lactobacillus brevis* и *Lactobacillus fermenti*, затем преобладают *Lactobacillus plantarum*. Виды порчи: ослизнение, размягчение, появление пленки. Хороший результат дает добавление 0,1% сорбиновой кислоты. Раздувание огурцов – образование пустот вследствие развития дрожжей, бактерий кишечной группы.

### **Задание**

1.Методом смыва и посева на МПА с мелом определить общее количество микроорганизмов и число молочнокислых бактерий в квашеной капусте. Сделать препараты из выросших колоний, покрасить фуксином и метиленовой синей.

2.Сделать препараты из поверхностной пленки на капусте или других квашеных овощах. Покрасить метиленовой синью. Смотреть с объективом 40х.

Зарисовать.

## **Микрофлора баночных консервов и методы ее определения**

Производство консервов основано на принципе герметизации и термической обработки продукта. Подготовленные продукты закладывают в жестяные или стеклянные банки, которые герметично (с удалением воздуха) укупоривают и стерилизуют или пастеризуют. Основное сырье (плоды, овощи, мясо и др.), а также вспомогательные материалы (соль, сахар, пряности и пр.), входящие в состав консервов, всегда в той или иной степени обсеменены различными микроорганизмами. Среди них могут встречаться возбудители порчи, обладающие термоустойчивыми спорами, а также токсинообразующие виды.

При подготовке продуктов к стерилизации некоторые технологические операции, такие как мойка, бланширование и особенно обжаривание снижают обсемененность микроорганизмами. Другие же - дочистка вручную, резка, приготовление фарша, укладка в банки и прочее вновь повышают ее. Режимы термической обработки консервов (температура и продолжительность) устанавливают в первую очередь на основании термоустойчивости микроорганизмов, способных к токсинообразованию в продуктах, а также основных возбудителей порчи каждого вида консервов. Термоустойчивость – это отношение вида микроорганизма к температуре, превышающей максимальную для его развития.

Надежность режима стерилизации зависит не только от количественного и видового состава микрофлоры консервируемого продукта, но и многих других условий. Имеет большое значение химический состав продукта, его рН. В кислой среде стерилизация достигается быстрее, т.к. ускоряется денатурация белков и клетки отмирают быстрее. Высокое содержание жира, а также соль,



сахар повышают термоустойчивость. В промышленности для каждого вида консервов устанавливают определенный режим стерилизации.

Консервы с невысокой кислотностью (овощные, рыбные, мясные и пр., имеющие  $pH > 4,4$ ), стерилизуют при  $t^\circ$  от  $110^\circ$  до  $120^\circ$ с от 20 до 50 мин. (в зависимости от вида продукта). Консервы с кислотностью  $pH < 4,4$  (некоторые овощные, плодово - ягодные) пастеризуют при  $t^\circ$  от  $85^\circ$  до  $100^\circ$ С, что обеспечивает гибель основных возбудителей порчи данных продуктов – неспорообразующих бактерий, дрожжей, плесневых грибов.

В практике консервной промышленности лишь для продуктов особого назначения добиваются абсолютной стерильности. Для большинства же консервов требуется промышленная стерильность, обеспечивающих гибель потенциальных возбудителей специфической порчи, а также токсичных видов.

Эффективность стерилизации зависит от исходного числа микроорганизмов в продукте. Чем больше их было, тем больше остается после стерилизации.

Часто в общей массе встречаются отдельные споры, более термоустойчивые, по сравнению с большинством. Они не подчиняются общей закономерности отмирания при стерилизации и сохраняются как «остаточная микрофлора» консервов. В состав этой микрофлоры в стерилизованных консервах входит ограниченное число видов, среди которых могут быть обнаружены виды, не влияющие на качество продукта (нейтральные), вызывающие порчу (бомбаж, плоское скисание и пр.), а также возбудители пищевых бактериальных отравлений. В пастеризованных консервах порчу могут вызывать сохранившиеся молочнокислые бактерии, дрожжи, но особенно опасны маслянокислые клостридии.

Остаточная микрофлора стерилизованных консервов представлена спорообразующими бактериями, среди которых преобладают три группы: мезофильные бациллы, мезофильные клостридии и термофильные клостридии и бациллы (рис. 21).

### **1. Мезофильные бациллы.**

Это – род *Bacillus*, палочки, грам+ образуют эндоспоры, факультативные анаэробы, большинство обитают в почве. По своим физиологическим свойствам делятся на две подгруппы: а) культуры, образующие при разложении углеводов большое количество газов; б) культуры, разлагающие углеводы с образованием кислоты, но не газа. К первой подгруппе относятся *Bacillus polymyxa* и *Bacillus macerans*. Они разлагают крахмал, пектиновые вещества, интенсивно сбраживают гексозы, пентозы, органические кислоты, спирты. Устойчивы к кислотности, развиваются в консервах, содержащих до 25% сахарозы. Вызывают образование пены, слизи, кисловатый запах (в компотах, томатных консервах и др).

Ко второй подгруппе относятся *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus* (в определителе Берги считается как синоним *Bacillus subtilis*).

У многих представителей этой группы активно выражены протеолитические свойства, они расщепляют белки и дезаминируют аминокислоты. Они образуют кислоты (молочную) и ацетилметилкарбинол из глюкозы, разлагают другие углеводы также с образованием кислот, восстанавливают нитраты. Развиваются в широком диапазоне температур от 5°C до 40 -45 C.



Число спор мезофильных бацилл в продуктах перед стерилизацией исчисляется десятками и сотнями клеток в 1 г. Они часто обнаруживаются не только в продуктах перед стерилизацией, но и среди остаточной микрофлоры – готовых консервов, но, как правило, не вызывают видимых изменений свойств и качества продуктов.

При исследовании тысяч банок разных видов доброкачественных консервов (растительных и мясных) выявлено, что 58-60% остаточной микрофлоры принадлежало к мезофильным бациллам (*Bacillus subtilis*, *Bac. mesentericus* и др., а также их различные штаммы и разновидности). Вполне доброкачественные на вид и вкус консервы могут содержать какое-то количество указанных видов бацилл, которые не развиваются в банках, вследствие ослабления их биохимической и физиологической активности после термической обработки, а также из-за недостатка кислорода. Возможность развития мезофильных бацилл в консервированных продуктах определяется массивностью их обсеменения, рН и рецептурой консервов. Вид *Bacillus cereus* также принадлежит к этой группе, но является потенциально опасным возбудителем пищевых отравлений (токсикоинфекции). *Bacillus cereus* – аэроб,  $t^{\circ}$  опт. = 30-32 С, оптимум рН от 7,0 до 9,5, обладает протеолитическими свойствами и может расщеплять сахара, способен развиваться при концентрации соли до 10-15% и сахара до 30-60%, широко распространены в природе, для микрофлоры кишечника нехарактерны.

Рис. 21. Остаточная микрофлора консервов.

## **2. Мезофильные клостридии.**

Эта группа наиболее опасна, как остаточная микрофлора консервов. Основное их местообитание – почва. Мезофильные клостридии – это

споробразующие грам + палочки, температура развития от 10 С до 45 С, каталазонегативные, строгие анаэробы.

Свойства клостридий разнообразны - они разлагают белки и сбраживают углеводы, расщепляют пектиновые вещества, крахмал и т.д. При анализе готовых консервов, а также продуктов перед стерилизацией основное внимание сосредотачивают на выявлении в них клостридий.

Пищевые отравления вызывают два вида: *Clostridium botulinum* и *Clostridium perfringens*.

По своим биохимическим свойствам и способности к токсинообразованию клостридий можно разделить на три подгруппы:

а) гнилостные клостридий - разлагают преимущественно белки. Очень термоустойчивые споры. Вызывают почернение продукта, не развиваются при рН ниже 5,6, вызывают бомбаж мясных и мясоовощных консервов. Типичные виды *Clostridium sporogenes*, *Clostridium putrificum*.

б) разлагают белки, но могут сбраживать углеводы. Это *Clostridium botulinum*, штампы А, В, F, С, D, Е. Термоустойчивость спор до 121°С., период накопления токсина в консервах при t° от 10 до 45°С колеблется от 3-х до 300 суток.

Возможность развития и токсинообразования зависит от рН (граница рН 4,4) содержания соли сахара в продукте (соли не более 10% , сахара не более 50%). Внешне развитие в продукте часто не проявляется. Особенно в подкисленной среде. Контроль банок и продукта по внешнему виду практически не выполним. Определяют токсичность продукта путем биопробы (на мышах).

К группе токсичных клостридий относится также *Clostridium perfringens* – типы А, В, С, D, Е.

Наиболее опасны А и С. В основном развиваются в мясных продуктах. Широко распространены в природе - встречаются на сырье растительном и животном, в воде, пряностях, крупе, муке. Могут развиваться в консервах с рН от 3,5 до 5,3 и выше. В цельно консервированных томатах, шпинате, щавелевом пюре, консервированных огурцах, обеденных консервах с мясом действующих при  $t^{\circ}$  от 16 $^{\circ}$ С и далее, что сопровождается часто бомбажом банок. При рН выше 5,6 в продуктах почти всегда образуются токсины.

в) масляно-кислые – *Clostridium butyricum*. Проявляют сахаролитические свойства. Более кислостойчивые, чем протолитические виды. Масляно-кислые вызывают бомбаж консервов, в том числе томатопродуктов, при этом продукт как бы кипит. Встречаются в рыбных консервах в томатном соусе. Токсин не образуют. В результате продукт приобретает неприятный кисло-гнилостный запах, пениться.

### **3. Термофильные клостридии и бациллы.**

Большой вред консервному производству могут принести термофильные микроорганизмы - бациллы и клостридий. Действуют при  $t = 50-60^{\circ}$ С. Они обладают термоустойчивыми спорами и выдерживают самые высокие режимы стерилизации. Сильно обсемененные могут быть овощи, особенно картофель, зеленый горошек, сахар, мука, молоко, различные специи. Иногда сырье содержит до 10 тысяч спор на 1г продукта. Если обсемененность 1г продукта до стерилизации такова, то готовая продукция может содержать от 10 до 100% нестерильных банок.

Среди термофилов, как и среди мезофилов, встречаются аэробы облигатные анаэробы и факультативные анаэробы. Аэробные - *Bacillus aerothermophilus*. Факультативно-анаэробные – *Bacillus coagulans*, *Bac. stearothermophilus*. Облигатные анаэробы: *Clostridium thermosaccharolyticum*. Термофилы могут вызывать три вида порчи: плоскокислое, сероводородное и бомбаж. Плоскокислая порча характеризуется прокисанием продукта, но без внешнего изменения банки. Разжижение, расслоение продукта вызывают *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*. Все они образуют (из углеводов) кислоты: молочную, уксусную, иногда муравьиную без видимого газообразования. Хорошо развиваются в зеленом горошке, сахарной кукурузе и многих видах пюреобразных консервов, содержимое которых подкисляется до pH 4,0-4,5 (начальное pH 6,0-6,2).

*Bacillus coagulans* были выделены различными исследованиями из консервов «Пюре из моркови», «Пюре из шпината», «Суп-пюре томатный» и других консервов для детского и диетического питания.

Сероводородная порча: возбудитель ее - *Clostridium nigrificans*. Продукт чернеет, так как идет разложение цистеина с образованием  $H_2S$ , который дает с железом продукта или банки черное окрашивание.

Бомбаж. Его возбудитель – термофил *Clostridium thermosaccharolyticum*. Выделяет  $CO_2$ ,  $H_2$ , кислоты: уксусную, масляную, белки не разлагает.

В пастеризованных консервах – компотах, соках могут сохраняться молочнокислые бациллы – лейконосток (вызывает слизистые комки, тягучесть). В рыбных консервах в масле и плохо прогреваемых полуконсервах (ветчина в банках) могут сохраняться стафилококки. На органолептику они не влияют, но могут стать причиной пищевых отравлений (стафилококковый энтеротоксин).

Кроме остаточной микрофлоры, в консервах может присутствовать и вызывать порчу, так называемая «вторичная микрофлора», попадающая в банки после стерилизации, в результате их негерметичности, чаще всего с оборотной водой при охлаждении банок в автоклавах. Видовой состав вторичной микрофлоры самый разнообразный. Выявление неспорообразующих видов в консервах свидетельствует, как правило, о негерметичности банок. Иногда такой результат свидетельствует о некачественном анализе.

### Задание

1. Проверить герметичность банок. Для этого чистые банки (стекло или жести) тех или иных консервов помещают в воду в вертикальном положении с таким расчетом, чтобы слой воды над банкой составляли 25-30 мм. Воду нагревают до 85° С и выдерживают банки в горячей воде в течение 5-7 мин. появление пузырьков воздуха в каком-либо месте свидетельствует о негерметичности банки. Такие банки анализу не подлежат.

2. Анализ продукта из чистой герметичной банки любого вида стерилизованного продукта (зеленый горошек, мясоовощные консервы и др.) проводится следующим образом: протирают крышки спиртом, затем ватный тампон поджигают и пробивают крышки металлическим заостренным пробойником (диаметр в сечении 1 см). Отбирают пробу продукта стерильными стеклянными трубочками с внутренним диам. 0,8 см. Вносят пробу (примерно 2-3 г) в каждую из двух пробирок с МПБ (для выявления аэробов) и в каждую из двух пробирок со средой Китта-Тароцци (см. прилож.) для выявления анаэробов. Пробирки выдерживают в термостате с  $t = 35^{\circ}-37^{\circ}\text{C}$  в течение 72 часов, после чего просматривают. При обнаружении признаков роста (помутнение, газ и пр.) из пробирок с МПБ делают обычный посев на МПА (для аэробов). Из пробирок со средой Китта-Тароцци делают глубинный

посев в чашки, заливают толстым слоем (до 1 см) МПА, тщательно перемешивают и после застывания среды посев накрывают стерильным предметным стеклом, плотно прижимая его к поверхности агара. При наличии анаэробов они образуют колонии, которые развиваются узкой полоской в толще агара ближе к центру стекла.

Из выросших колоний сделать фиксированные окрашенные препараты, смотреть с иммерсией.

## **Работа 8. МЕТОДЫ УЧЕТА И АНАЛИЗА МИКРОФЛОРЫ ВОДЫ, ВОЗДУХА, ОБОРУДОВАНИЯ И ДРУГИХ ОБЪЕКТОВ, СВЯЗАННЫХ С ПРОИЗВОДСТВОМ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ**

### **Микробиологическое исследование воды**

Степень зараженности воды микроорганизмами имеет важное значение в технологии пищевого производства. Качество поступающей в производстве воды должно полностью соответствовать ГОСТу и другим требованиям санитарного надзора. Возбудители многих пищевых кишечных заболеваний (бактерии дизентерии, брюшного тифа, паратифа и др.) выделяются больными и бактерионосителями вместе с фекалиями во внешнюю среду и, следовательно, могут попадать в открытые водоемы и водные источники.

Непосредственное определение патогенных микробов в воде в условиях пищевых предприятий и лабораторий, во-первых, не допускается, во-вторых, методически затруднено, так как многие их виды не поддаются выращиванию на стандартных питательных средах. Поэтому в лабораторной практике



присутствие этих микроорганизмов в воде обычно устанавливают косвенным путем, а именно: 1) определяют общее количество микроорганизмов в 1 мл воды; 2) определяют зараженность воды БГКП, так как последние являются специфическими представителями кишечной микрофлоры человека, где содержатся в огромных количествах (сотни миллионов на 1 г фекалий).

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

БГКП объединяет группу сходных между собой бактерий: *Escherichia coli commune*, *Escherichia coli citrovomm*, *Escherichia coli aerogenes*, *Bad paracoli* и др.

Основными морфологическими и физиологическими признаками этой группы являются следующие:

1) короткие бесспорные, грамотрицательные, в большинстве своем подвижные палочки;

2) аэробы и факультативные анаэробы;

3) сбраживают сахара: глюкозу, лактозу, маннит (в зависимости от разновидности) при температурах 43-45° С в течение 24 часов с образованием кислоты и газа;

4) растут на фуксиносульфитном агаре (среда Эндо) в виде темно-красных колоний с металлическим зеленовато-золотистым блеском или красных и розовых колоний с более темным центром.

При санитарно-гигиенической оценке воды важно не только найти БГКП, но необходимо учесть и количество этих бактерий, что позволит судить о степени фекального загрязнения воды. Для учета в воде определяют титр кишечной палочки (colі - титр) и индекс (colі- индекс). Коли-титром называется наименьшее количество воды (в мл), в котором обнаружена хотя бы одна палочка БГКП, коли-индекс – это число палочек, найденных в одном литре исследуемой воды.

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

Для определения общего количества микроорганизмов, в 1 мл. воды делают глубинный посев 1 мл исследуемой воды на 1 мясопептонный агар (МПА) в чашку Петри. Если вода сильно загрязнена, посев проводят с разведением (в зависимости от степени загрязненности). Методика посева с разведением описана в работе 6.

Посевы воды выращивают в термостате при температуре 30-35°С в течение 24-18 ч., после чего подсчитывают количество колоний на чашке. Подсчет колоний и определение количества микроорганизмов в 1 мл проводится по методике также описанной в работе 6. Во принятым нормам считается, что хорошая питьевая вода содержит в 1мл до 100 микроорганизмов, сомнительная от 100 до 500 микроорганизмов, загрязненности выше 500 вода требует очистки.

Для определения титра кишечной палочки в воде предложены методы бродильных проб, мембранных фильтров и других. Бродильный метод основан на способности БГКП сбраживать сахара с образованием газа и кислот в условиях повышенных температур (43°-45°С).

Для посева воды используется жидкая среда Булира (мясная вода - 1 л, пептон – 10 г, маннит – 15г, NaCl – 5г, 1% водный раствор нейтральрот-2 мл, который добавляют после доведения рН среды до 7,0-7,2). Указанная среда разливается в пробирки с маленькими перевернутыми пробирочками (поплавками) и стерилизуется дробно или 30 мин. при 0,5 атм. в автоклаве.

Для посева берут 1 мл. исследуемой воды, (методика посева с разведением описана в работе б).

Засеянные пробирки ставят на 45 часов в термостат при температуре 43°-45°С максимальной для БГКП, но угнетающей развитие большинства других сапрофитных микроорганизмов. При развитии БГКП на среде Булира отмечают следующее:

- 1) помутнение (развитие бактерий);
- 2) накопление газа в поплавках (сбраживание маната);

3) изменение окраски (кишечная палочка восстанавливает нейтральрот, благодаря чему красная окраска исчезает и среда приобретает соломенно-желтый цвет). Если газа и мути нет, это указывает на отсутствие фекального загрязнения. Наличие газа и помутнения или только помутнения указывает на возможность присутствия БГКП. Посев на среду Эндо. В связи с тем, что в пробах исследуемой воды, а также а смывах с оборудования, сырья, полуфабрикатов, пищевых продуктов, рук работников и других объектов могут

присутствовать различные бактерии, сбраживающие маннит с образованием газа, то для точного установления наличия БГКП из забродивших пробирок делают пересев на специфическую среду Эндо (способ приготовления указан на этикетки промышленно приготовленной сухой среды Эндо). Готовая среда в расплавленном состоянии имеет красноватый цвет, застывшая в чашках Петри – кремовый.

Среда Эндо готовится на 2-3 суток. При более длительном хранении ее необходимо держать в холодильнике.

Пересев со среды Булира на среду Эндо производят следующим образом: карандашом по стеклу размечают дно чашки на сектора по числу пробирок, в которых обнаружено помутнение и газообразование. Из каждой пробирки, захватив небольшое количество материала, делают высев с помощью петли в соответствующий сектор на чашку. Посев делают штрихом, проводя петлей зигзаг по поверхности агара для получения изолированных колоний. Чашки с посевом помещают в термостат при 37°C на 24 ч.

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

Если бродильная проба на среду Булира положительная и культура на среде Эндо имеет ярко-красные колонии, можно считать установленным присутствие в исследуемых пробах БГКП.

Из типичных колоний следует приготовить мазки и окрасить их по Граму. Обнаружение в мазках грамотрицательных палочек подтверждают наличие бактерий кишечной группы.

## **Задание**

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

## **Исследование микрофлоры воздуха**

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

На пищевых производствах приходится считаться с воздухом, как с фактором загрязнения полуфабрикатов и готовой продукции нежелательной микрофлорой.

Для исследования загрязненности воздуха микроорганизмами предложено несколько методов. Наиболее простым является метод оседания микроорганизмов на поверхность плотной питательной среды (седиментационный метод Коха).

Для выполнения работы берут 2 стерильные чашки Петри, в одну из них наливают 10-15 мл мясопептонного агара, а в другую – соответствующее

количество суслового агара. После застывания среды чашки подсушивают в термостате для удаления с поверхности среды влаги.

Закрытые чашки вносят в помещение, где исследуется воздух, ставят их на горизонтальную поверхность, снимают крышки и кладут одним краем на бумагу, а другим на край открытой чашки.

Чашки оставляют открытыми на 5-10 минут. После выдержки чашки закрывают и ставят перевернутыми в термостат с МПА при температуре 37°C на 1-2 суток, а с суловым агаром на 2-3 суток при 30°C.

Количество выросших колоний характеризует загрязненность воздуха. Для пересчета количества микробов на 1 м воздуха пользуется формулой В.Л. Омелянского, согласно которой в течение 5 мин. на площадь 100 см<sup>2</sup> (плотной питательной среде) оседает столько микробов, сколько их содержится в 10 л воздуха (1/100 м ) при условии, если воздух находится в состоянии покоя. В зависимости от диаметра и площади чашек Петри были рассчитаны постоянные множители, на которые надо умножать число колоний, выросших на данной чашке.

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

Например: если на чашке площадью 78 см<sup>2</sup> выросло 25 колоний, то количество микробов в 1 м<sup>3</sup> = 25x60 = 1500.

Полученные результаты характеризуют обсемененность выпадающих капельных частиц, находящихся в воздухе, что дает ориентировочное представление об общей обсемененности воздуха микроорганизмами. Но седиментационный метод удобен для практической работы. Им широко пользуются для выяснения степени загрязнения воздуха в разных помещениях, когда ставят задачи определения общего санитарного состояния или эффективности вентиляции и уборки помещения. Применяя специальные среды, этим методом можно определить обсемененность воздуха разными группами и видами микроорганизмов.

### **Задание**

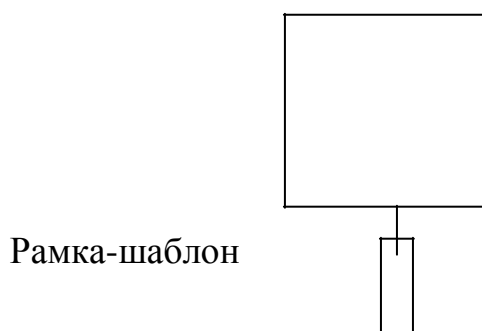
1. Провести посев воздуха в лаборатории и боксе методом оседания на МПА и СА.

2. Провести количественный (по формуле Омелянского) и качественный (микроскопированием) анализ микрофлоры воздуха указанных помещений.

### **Санитарно-бактериологическое исследование оборудования, инвентаря, рук работающих и других объектов, связанных с производством пищевой продукции**

Отбор проб для исследования микрофлоры оборудования проводится методом смыва тампоном смоченным стерильной водой с площади ограниченной рамкой-шаблоном. Рамка-шаблон изготовлен из проволоки. Имеет площадь 100 см<sup>2</sup> (10 x 10). Перед взятием пробы-шаблон обжигают в пламени горелки. Ватный тампон смачивают водой из пробирки с 10 мл

стерильной водой и, произведя смыв, опускают его в пробирку. Пробирку хорошо встряхивают и делают посев по 1 мл на МПА и в пробирки со средой Булира или Кесслера для выявления БГКП. Посевы выращивают при  $t^{\circ} 37^{\circ}\text{C}$  в течение 24 час. Учитывая число колоний на МПА делают пересчёт на  $1 \text{ см}^2$  площади оборудования по формуле  $M = n \cdot 10/s$ , где  $M$  – общая бактериальная обсеменённость,  $n$  – количество колоний в 1 мл смыва,  $10$  – количество стерильной воды (мл),  $s$  – площадь с которой произведён смыв. Рассчитав общую обсеменённость объекта заполняют таблицу и делают вывод о его санитарном состоянии.



Оценка	Общая обсеменённость КОЕ/см <sup>2</sup> .
Чистый	до – 10 000
Умер. загрязн.	10000 – 100 000
Сильная загрязн.	Более 100 000

Анализ микрофлоры рук. Для проверки личной гигиены

обслуживающего персонала производят анализ рук на кишечную палочку и общее количество бактерий. При массовых анализах удобен следующий метод – через ватную пробку, вставленную в пробирку с 10 мл воды, пропускают палочку или толстую алюминиевую проволоку с ватным тампоном на конце и стерилизуют. Тампон не должен касаться воды.



## **Задание**

Сделать смыв с оборудования и рук. Сделать посеы смывов на МПА и среды для выявления БГКП. Провести подсчет и анализ микрофлоры.

### **Работа 9. ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ БЕЗАЗОТИСТЫХ И АЗОТОСОДЕРЖАЩИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ (ПРОЦЕССЫ БРОЖЕНИЯ И ГНИЕНИЯ)**

Процессы брожения, вызываемые микроорганизмами, являются важнейшими звеньями превращения безазотистых органических веществ. Эти превращения очень сложны и разнообразны.

Каждый вид брожения вызывается определенным видом (группой) микроорганизмов.

Многие виды брожений широко используются в промышленности. С другой стороны, возбудители многих брожений вызывают порчу пищевых продуктов и напитков.

#### **Спиртовое брожение**

Одним из важнейших брожений в промышленности является спиртовое брожение углеводов, которое вызывается дрожжами, некоторых видов бактерий и муковок грибов.

Дрожжи рода *Saccharomyces* наиболее полно и быстро расщепляют сахар до конечных продуктов, вследствие чего имеют наиболее важное промышленное значение. Анаэробная природа спиртового брожения впервые

была установлена Пастером. Ход брожения очень сложен, он состоит из нескольких этапов, в которых участвуют ферменты дрожжевой клетки. Суммарное уравнение спиртового брожения следующее:

$C_6H_{12}O_6 = 2CH_3CH_2OH + 2CO_2 + 118 \text{ кДж}$  Способность дрожжей сбраживать сахар в течение определенного времени называется *энергией брожения*.

Учет энергии брожения проводится путем определения количества образовавшегося  $CO_2$  и этилового спирта.

### Постановка опыта

В качестве питательной среды для дрожжей используется среда следующего состава:

сахароза - 15 г	$KH_2PO_4$ - 0,3
пептон - 0,5 г	$MgSO_4$ - 0,1г
вода 100 мл	

Среду разливают по 100 мл в колбы, емкостью 250-300 мл и стерилизуют при 0,5 атм. 30 мин. Колбу - со 100 мл среды вносят немного (1 г) сухих прессованных дрожжей. Колбу закрывают каучуковой пробкой, в которую вставлен затвор Мейссля. Затвор устроен таким образом, что легко пропускает выделяющийся  $CO_2$ , но задерживает пары воды и спирта, которые; поглощаются налитой и в затвор крепкой серной кислотой. На затвор надевается небольшой кусок толстостенной каучуковой трубки, верхний конец которой крепко закрыт кусочком стеклянной палочки, а боковая стенка имеет небольшой продольный разрез.

Колбы взвешивают на технических весах с точностью до 0,01 г и ставят в термостат при температуре 28°C на двое – трое суток.

Условия, способствующие развитию дрожжей, но препятствующие росту других микроорганизмов, будут следующие:

1. Высокая концентрация сахара (15%);
2. Кислая среда за счет  $KH_2PO_4$  (pH=5,0);

3. Накопление значительного количества спирта;

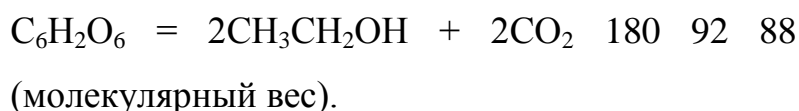
4. Анаэробные условия.

Сумма этих факторов делает среду селективной для культуры дрожжей.

### **Исследование результата опыта на спиртовое брожение**

Конец брожения устанавливается по прекращению газообразования. По окончании опыта колбу снова взвешивают. Количество выделенной углекислоты в граммах определяют по разнице между начальной массой колбочки и ее конечной массой после брожения.

Для определения энергии брожения используют суммарное уравнение спиртового брожения:



Из этого уравнения следует, что на долю  $\text{CO}_2$  приходится почти 50% сброженного сахара.

Например, в нашем опыте среда содержит 15г сахара. Из этого количества может выделиться около 7-7,5г углекислоты. Зная количество выделившейся углекислоты, легко определить количество образовавшегося спирта и количество сброженного сахара (энергия брожения).

### ***Пример расчета***

Допустим, что потеря в весе колбочки (т.е. количество выделившегося  $\text{CO}_2$ ) равна 7,0 г, тогда исходя из вышеуказанного уравнения, количество образовавшегося спирта будет равно:

92-88

92

7

x-7

$$x = \frac{7}{88} = 7,2 \text{ г. спирта}$$

88

Количество сброженного сахара соответственно будет равно:

180-88

180 7

x1-7

$$x = \frac{180 \cdot 7}{88} = 14,2 \text{ г. сахара}$$

88

Количество сброженного сахара = количеству образовавшегося спирта + количество выделившегося  $\text{CO}_2$ , т.е.  $14,2 = 7,2 + 7$  г.

Энергию брожения, выраженную в процентах сброженного сахара за определенный промежуток времени, вычисляют следующим образом: исходная среда содержала 15% сахарозы, эту величину принимают за 100, тогда из следующей пропорции 15 — 100 получают показатель энергии брожения:

14,2 - x

дрожжей:

14,2

100

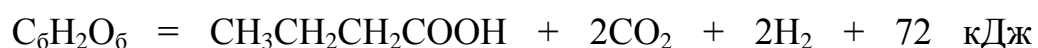
$$x = \frac{14,2 \cdot 100}{15} = 96\%$$

15

## **Маслянокислое брожение**

Маслянокислое брожение представляет собой процесс анаэробного разложения углеводов, при котором образуется масляная кислота, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> и др. побочные продукты.

Суммарное уравнение маслянокислого брожения:



Возбудители этого процесса маслянокислые клостридии широко распространены в почвах, в придонных иловых отложениях и др. местах, где нет доступа воздуха.

Маслянокислые клостридии представляют собой довольно крупные, подвижные палочки, грам +, образуют споры, превышающие диаметр клетки, строгие анаэробы, типовой вид *Clostridium butyricum*. Оптимальные t° развитие 35°-40° С, термоустойчивость спор -110°-115°С в течение 10-15 мин.

В бродильной промышленности маслянокислое брожение приносит большой вред, т.к. масляная кислота угнетает спиртовое брожение и придает горький вкус и неприятный запах готовой продукции.

Еще более опасным это брожение является для консервной промышленности, где в результате брожения возникает бомбаж банок и резкое прогоркание продуктов.

### **Постановка опыта на маслянокислое брожение (на картофеле)**

Неочищенный сырой картофель нарезают мелкими кусочками, заполняют им 1/4 объема высокой пробирки, заливают водопроводной водой на

2/3 объема пробирки, добавляют немного мела, для нейтрализации образующейся масляной кислоты, и ставят в водяную баню с  $t^{\circ} = 80^{\circ}\text{C}$  на 10-15 мин. (пастеризация). После этого пробирки охлаждают под краном и ставят в термостат при  $t=35^{\circ}\text{C}$  на 2-3 сут. При развитии маслянокислого брожения картофель всплывает, на поверхности наблюдается обильное газообразование.

Препарат готовят непосредственно из пробирки, для чего берут петлей каплю жидкости со дна пробирки, наносят на предметное стекло, подкрашивают раствором Люголя и накрывают покровным стеклом. Смотрят с иммерсией. При микроскопировании обнаруживаются крупные подвижные палочки с утолщенными концами или с утолщением в середине клеток (кlostридии). В местах утолщения заметны овальные тельца, сильно преломляющие свет - споры.

### **Аммонификация или гниение белковых веществ**

Гниением или аммонификацией называется процесс разложения белковых веществ. Эти вещества гидролизуются до аминокислот под действием протеолитических ферментов. Промежуточными продуктами белкового распада являются летучие жирные кислоты, спирты, индол, скатол и др. Конечными продуктами: аммиак ( $\text{NH}_3$ ), сероводород ( $\text{H}_2\text{S}$ ),  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ . Процесс гниения может протекать как в аэробных, так и анаэробных условиях. При этом участвуют разные группы микроорганизмов, но главным образом многочисленные виды гнилостных бактерий и бацилл.

## Постановка опыта

Для культивирования аммонифицирующих бактерий можно пользоваться разными средами, содержащими белковые вещества, например, МПБ.

Для анализа берут пробирку с 10 мл МПБ, заражают небольшим комочком почвы. Пробирки закрывают ватными пробками, под которые подвешивают смоченную дистиллированной водой красную лакмусовую бумажку (для обнаружения выделяющегося аммиака) и полоску фильтрованной бумаги смоченной раствором уксуснокислого свинца (для выявления сероводорода). Пробирки покрывают сверху пергаментной бумагой и помещают в термостат при  $t = 25^{\circ} - 30^{\circ}\text{C}$  на 2-3 суток.

При исследовании результатов опыта обнаруживается:

- а) проба на аммиак - красная лакмусовая бумажка становится синей (подщелачивание среды)
- б) проба на сероводород - белая фильтровальная бумажка смоченная уксуснокислым свинцом чернеет в присутствии  $\text{H}_2\text{S}$ .

При рассматривании препарата в раздавленной капле наиболее часто обнаруживаются подвижные беспоровые палочки *Bacterium proteus*, и спорообразующие клостридии типа *Clostridium putrificum* и др.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

### Питательные среды

Используемые при исследовании микрофлоры сырья, полуфабрикатов, готовой продукции, а также других объектов, связанных с производством пищевых продуктов.

#### **Среды для бактерий. Среды для определения кишечной палочки.**

**Среда Булира.** На 1 л. мясопептонного бульона с нейтральной или слабощелочной реакцией (рН 7,0 - 7,2) прибавляют 10 г маннита или молочного сахара, бульон нагревают до полного растворения внесенных углеводов, фильтруют, прибавляют к фильтрату 6 мл 1%-ного раствора нейтральрота, разливают по пробиркам, в которые бросают сверху дном маленькие пробирочки (поплавки) стерилизуют при 1 атм. 10 мин. (вишнево-красный цвет).

**Среда Кесслера (модифицированная).** К 1л водопроводной воды прибавляют 50 мл свежей бычей желчи или желчи других сельскохозяйственных животных и 10г пептона, смесь кипятят 20-30 мин. на водяной бане при помешивании. Когда пептон растворится, фильтруют через вату, затем прибавляют 2,5г глюкозы. По растворению устанавливают щелочную реакцию по лакмусу или слабощелочную по фенолфталеину (рН 7,6) и добавляют 2 мл 1%-ного водного раствора генцианвиолета. Среду разливают по пробиркам с бродильными пробирочками и стерилизуют при 1 атм. 15 мин.

**Агар с мелом (для молочнокислых бактерий).** Для лучшего распознавания колоний молочнокислых бактерий к питательному агару (сывороточному, из гидрализованного молока и т.п.) перед стерилизацией прибавляют мел (от 2-3%). Выросшие колонии молочнокислых микробов устанавливают по прозрачным зонам вокруг них (работа 7).



## **Среды для анаэробов. Среда Китта-ТароцЦН.**

В высокую пробирку с нейтральным МПБ вносят кусочки сваренной и промытой кипящей водой на сите печени (3-5 г на пробирку) или мясной фарш. Заливают на 2/3 уровня пробирки. Сверху среду покрывают тонким слоем вазелинового масла и стерилизуют при 120°C в течение 30 мин. Перед посевом пробирки прогревают в кипящей водяной бане в течение 15-20 мин. (для удаления воздуха) и быстро охлаждают.

## **Для стафилококков (*Staphylococcus aureus*)**

Кровяной МПА. К расплавленному и охлажденному до 50°C мясопептонному агару стерильно добавляют 5-10% дефибринированной крови, перемешивают и разливают по бактериологическим чашкам (чашкам Петри). Чашки с агаром ставят в термостат при  $t = 37^{\circ}\text{C}$  на сутки для проверки стерильности среды.

## **Желточно-солевой агар**

40 г. сухого МПА, NaCl - 90 г на 1000 мл воды варить 3 минуты, после чего охладить до комнатной температуры. 2 яичных желтка размешать в 100 мл физиологического раствора. Все смешивают и используют для выявления токсигенных стафилококков (работа 7).

## **Среда для обнаружения термофилов**

Глюкозопептонный агар с бромкрезол пурпуром.

Состав: пептон-10 г, глюкоза-5 г, агар-15 г, бромкрезол пурпур-0,04 г, вода-1000 мл. Стерилизуют атм. 0,5 в течение 30 мин. Посевы выращивают при 55°-60° С в течение 48 часов. При развитии на сред колоний термофилов возбудителей плоского скисания вокруг каждой образуется на пурпурном фоне жёлтый ореол, вследствие взаимодействия образующейся кислоты с индикатором.

Среда для выделения слизеобразующих бактерий. Приготовить МПА+10% сахарозы.

### **Среды для грибов. Агар Чапека (ЧА)**

Для культивирования мицелиальных грибов кроме сусло-агара в практике широко используются синтетические среды, в частности агар Чапека в составе: азотнокислого натрия ( $\text{NaNO}_3$ )-3 г, фосфорнокислого калия ( $\text{KHP0}_4$ ) - 1 г, сернокислого магния ( $\text{MgSO}_4$ )-0,5 г, хлористого калия ( $\text{KC1}$ )-0,5 г, сернокислого железа ( $\text{FeS}$ )- 0,01 г, сахарозы-30 г, воды дистиллированной-1000 мл.

После растворения указанных веществ прибавляют в раствор 2,5% агара для получения плотной среды и стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм. в течение 20 мин или дробной стерилизацией.

### **Дрожжевая вода**

80 г прессованных дрожжей разводят в 1 л водопроводной воды. Кипятят 20 мин, затем фильтруют через бумажный фильтр, разливают в посуду и стерилизуют 20 мин при 1 атм. (пересованные дрожжи можно заменить сухими из расчёта 20 г на 1 л).

При приготовление дрожжевой воды с сахаром к готовой среде добавляют 2% глюкозы или сахарозы и стерилизуют 20 мин. при 0,5 атм.

### **Среда Сабуро**

К 100 мл дрожжевой стерильной воды добавляют 5 г пептона, 4 г глюкозы, 1,8 г агара. Стерилизуют 30 мин. при 0,5 атм.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов. СанПиН 2.3.2 560-96 М. 1997.
2. ГОСТ 30425-97 Консервы. Методы определения промышленной стерильности. Сборник М.: Изд. Стандартов, 1998 г.
3. ГОСТ 9225-84 Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа.
4. Жарикова Г.Г., Козьмина А.О. Микробиология санитария и гигиена пищевых продуктов. Гелан, Москва, 2001 г. 247 с.
5. Бабьева И.П., Голубев В.И. Методы выделения и идентификация дрожжей. М.: Пищепромиздат, 1997, 120 с.
6. Теппер Е.З., Шильникова В.К. Практикум по микробиологии. М.: Колос, 1979, 216с.
7. Смирнова Т.А., Кострова Е.И. Микробиология зерна и продуктов его переработки. М.: ВО Агропромиздат, 1989, 157 с.
8. Техническая микробиология рыбных продуктов. М.: Пищевая промышленность, 1976, 266с.
9. Панов В.П., Кострова Е.И., Кондратьева С.М. «Техническая микробиология пищевых продуктов». Курс лекций. М.: 1998 г., 112 с.

Выписка из протокола №7 от 13.06.02.г.  
заседания кафедры «Технология продуктов питания и  
экспертизы товаров»

Слушали: О готовности лабораторного практикума по  
дисциплине «Микробиология» для студентов  
специальностей 2701, 2703, 2704, 2705, 2707, 2708,  
2710, 2712, 3511 МГТА.

Авторы: доценты кафедры «Технология продуктов питания  
и экспертизы товаров» Кострова Е.И., Журавко Е.В.

Постановили: Рекомендовать вышеназванный лабораторный  
практикум к изданию в РИО МГТА.

Секретарь

Аникеева Л.Ф.