


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫС-
ШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КАМЧАТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ФГБОУ ВО «КамчатГТУ»)

НАУЧНО-ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР «ЭКОЛОГИЯ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЕ»

Кафедра «Экология и природопользование»

УТВЕРЖДАЮ

руководитель департамента ПБТ

 /В. Б. Чмыхалова/

«23» 10 2024 г.

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ

«Пищевая микробиология»

направление подготовки
19.03.04 Технология и продукции и организация общественного питания
(уровень бакалавриата)

направленность (профиль):
«Технология и продукции и организация общественного питания»

Петропавловск-Камчатский,
2024

Рабочая программа по дисциплине «Пищевая микробиология» составлена на основании ФГОС ВО направления подготовки 19.03.04 «Технология и продукции и организация общественного питания»

Составитель рабочей программы:

Доцент кафедры ЭП  Королёва Т.Н.

Рабочая программа рассмотрена на заседании кафедры ЭП

«23» 10 2024 г., протокол № 5/1

И.о. заведующего кафедрой ЭП

«23» 10 2024 г.,  Авдощенко В.Г.

1 Цели и задачи учебной дисциплины

Целью дисциплины «Пищевая микробиология» является изучение биологических свойств микроорганизмов, их роли в процессах порчи и сущности микробиологических процессов, протекающих при выработке пищевых продуктов.

Задачи дисциплины – освоение теоретических основ микробиологии пищевых продуктов, которые ориентируют специалистов на необходимость обеспечения высокого санитарно-гигиенического состояния производства, предупреждение потерь и изготовление доброкачественной продукции; формирование навыков экспериментальной работы и проведения микробиологического анализа.

2 Требования к результатам освоения дисциплины

Процесс изучения дисциплины направлен на формирование профессиональной компетенции:

– способен применять основные законы и методы исследований естественных наук для решения задач профессиональной деятельности (ОПК-2).

Планируемые результаты освоения практики, соотнесенные с планируемыми результатами освоения образовательной программы, представлены в таблице.

Таблица – Планируемые результаты обучения по дисциплине, соотнесенные с установленными в программе бакалавриата индикаторами достижения компетенций

Код компетенции	Наименование компетенции	Код и наименование индикатора достижения	Планируемый результат обучения по дисциплине	Код показателя освоения
ОПК-2	способен применять основные законы и методы исследований естественных наук для решения задач профессиональной деятельности	ИД-1_{ОПК-2} : Знает основные законы и закономерности математических, физических, химических и биологических наук и их взаимосвязи. ИД-2_{ОПК-2} : Умеет решать профессиональные задачи с применением основных законов математических, физических, химических и биологических наук.	Знать: – правила безопасности работы в микробиологической лаборатории; – основную микробиологическую посуду, инструменты, питательные среды и методы их стерилизации; – различные группы микроорганизмов, являющихся представителями полезной микрофлоры пищевых продуктов; – технически вредную микрофлору и роль ее в процессах порчи пищевых продуктов; – основы микробиологического и санитарного контроля на предприятиях отрасли; – критерии безопасности и санитарные нормы качества пищевых продуктов.	З(ОПК-2)1 З(ОПК-2)2 З(ОПК-2)3 З(ОПК-2)4 З(ОПК-2)5 З(ОПК-2)6
			Уметь: – готовить и микроскопировать препараты микроорганизмов; – проводить микробиологическое исследование пищевых продуктов; – применять полученные знания при изучении специальных дисциплин и при	У(ОПК-2)1 У(ОПК-2)2 У(ОПК-2)3

Код компетенции	Наименование компетенции	Код и наименование индикатора достижения	Планируемый результат обучения по дисциплине	Код показателя освоения
			<p>последующей самостоятельной работе на производстве;</p> <ul style="list-style-type: none"> – работать с ГОСТами и инструкциями; – объективно оценивать качество сырья и продуктов по микробиологическим показателям; – применять полученные знания для хранения сырья, создания прогрессивных технологических схем его переработки. 	<p>У(ОПК-2)4</p> <p>У(ОПК-2)5</p> <p>У(ОПК-2)6</p>
			<p>Владеть:</p> <ul style="list-style-type: none"> — навыками обсуждения и интерпретации экспериментальных данных; — навыками идентификации микроорганизмов; — навыками информационного поиска по вопросам микробиологии пищевых продуктов. 	<p>В(ОПК-2)1</p> <p>В(ОПК-2)2</p> <p>В(ОПК-2)3</p>

3 Место дисциплины в структуре образовательной программы

Учебная дисциплина «Пищевая микробиология» является дисциплиной обязательной части в структуре образовательной программы.

4. Содержание дисциплины

4.1 Тематический план дисциплины

Очная форма обучения

Наименование разделов и тем	Всего часов	Контактная работа	Контактная работа по видам учебных занятий				Самостоятельная работа	Формы текущего контроля	Итоговый контроль знаний по дисциплине
			Лекции	практические занятия	Лабораторные работы	СПР			
Раздел 1 Основные группы микрофлоры, факторы внешней среды и механизм их действия на микроорганизмы	52	22	6	-	16	-	30	Тест	
Тема 1: Основные группы микроорганизмов, встречающихся в пищевых продуктах, и процессы ими вызываемые. Представители	16	6	2	-	4	-	10	Опрос, выполнение и защита лаборатор-	

технически вредной микрофлоры								ной работы	
Тема 2: Патогенные и условно-патогенные микроорганизмы	18	8	2	-	6	-	10	Опрос, выполнение и защита лабораторной работы	
Тема 3: Влияние факторов внешней среды на развитие микроорганизмов	18	8	2	-	6	-	10	Опрос, выполнение и защита лабораторной работы	
Раздел 2. Микрофлора сырья. Факторы, обуславливающие естественную защиту сырья, используемого в пищевой промышленности	56	26	10	-	16	-	30	Тест	
Тема 4: Микрофлора плодов и овощей. Микрофлора квашеных овощей и плодов	15	5	3	-	2	-	10	Опрос, выполнение и защита лабораторной работы	
Тема 5: Микрофлора кулинарных изделий из сырья растительного происхождения	24	14	4	-	10	-	10	Опрос, выполнение и защита лабораторной работы	
Тема 6: Основные принципы консервирования и хранения пищевых продуктов. Современные методы дезинфекции технологического оборудования, применение новых дезинфицирующих веществ	17	7	3	-	4	-	10	Опрос, выполнение и защита лабораторной работы	
Экзамен	36								+
Всего	144	48	16	-	32	-	60		36

4.2 Содержание дисциплины

Раздел 1. Основные группы микрофлоры, факторы внешней среды и механизм их действия на микроорганизмы

Тема 1: Основные группы микроорганизмов, встречающихся в пищевых продуктах, и процессы ими вызываемые. Представители технически вредной микрофлоры

Лекция

Представители технической полезной микрофлоры и их использование. Молочнокислые бактерии. Дрожжи. Уксуснокислые бактерии, их характеристика. Пропионовокислые бактерии, их характеристика. Молочнокислое брожение: гомо- и гетероферментативное, спиртовое, пропионовокислое брожение. Характеристика возбудителей всех видов брожения. Промышленное получение молочной кислоты и ее использование в производстве пищевых продуктов. Использование молочнокислых бактерий и их роль в процессах порчи пищевых продуктов. Химизм

спиртового и уксуснокислого и пропионового кислого брожения. Характеристика дрожжей, встречающихся в производстве пищевых продуктов, их промышленное использование и роль в процессах порчи пищевых продуктов.

Гнилостные бактерии. Основные продукты аэробного и анаэробного гниения и характеристика возбудителей гниения. Отрицательная роль гнилостных бактерий в производстве и хранении пищевых продуктов. Микроскопические грибы. Роль микроскопических грибов в процессах порчи пищевых продуктов. Использование микроскопических грибов в производстве органических кислот, мягких сыров.

Основные понятия темы: технически полезная микрофлора, бактерии, дрожжи, возбудители брожения, процесс порчи пищевых продуктов, гнилостные бактерии, значение грибов в производстве пищевых продуктов.

Вопросы для самоконтроля:

1. Что составляет основу жизнедеятельности микроорганизмов?
2. Какие микроэлементы находятся в клетках микроорганизмов?
3. Особенности использования микробных ферментов.
4. Почему аденозинтрифосфат называют «энергетической валютой» клетки?
5. Назовите общие условия спиртового брожения.
6. Что понимается под «молочнокислым брожением»?
7. Что образуется в результате маслянокислого брожения?
8. Охарактеризуйте понятие «гниение».
9. Приведите пример наиболее распространенных гнилостных бактерий.

Литература: [1], [2], [3], [4], [5], [6], [7].

Лабораторная работа. Микробиологическая лаборатория и правила работы в ней. Устройство микроскопа и его использование в микробиологической практике

В ходе выполнения лабораторной работы изучают устройство микроскопа и правила работы с ним. Проводят микроскопирование готовых препаратов с объективом 8x или 10x и 90x или 100x. Формулируют вывод и оформляют отчет.

Литература: [1], [2], [3], [4], [5], [6], [7].

Тема 2: Патогенные и условно-патогенные микроорганизмы

Лекция

Патогенные микроорганизмы – возбудители пищевых инфекций. Их характеристика. Химический состав и свойства микробных токсинов. Виды пищевых инфекций. Мероприятия, направленные на предотвращение распространения инфекций через пищевые продукты. Мероприятия, направленные на предотвращение развития условно-патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах.

Основные понятия темы: патогенные микроорганизмы, экзотоксины, эндотоксины, инфекции, пищевые отравления, особенности предотвращения распространения инфекций и развития условно-патогенных микроорганизмов.

Вопросы для самоконтроля:

1. Какие микробы называют патогенными?
2. Перечислите микробные токсины.
3. Что является резервуаром возбудителей инфекционных заболеваний?
4. Назовите источники заражения продуктов питания?
5. Перечислите основные профилактические мероприятия для предотвращения распространения инфекций.

Лабораторная работа. Дезинфекция и стерилизация

В ходе выполнения лабораторной работы изучают основные методы дезинфекции и стерилизации. Проводят подготовку к стерилизации и стерилизацию лабораторной посуды: чашек Петри, пробирок и пипеток. Формулируют вывод и оформляют отчет.

Лабораторная работа. Приготовление препаратов микроорганизмов

В ходе выполнения лабораторной работы изучают особенности приготовления препаратов бактерий в «раздавленной» и «висячей» капле. Выполняют приготовление фиксированных препаратов и окрашивание их простым способом, сложным способом (по Граму), и способом, при котором окрашиваются споры. Затем микроскопируют окрашенные препараты, оформляют отчет, формулируют выводы.

Литература: [1], [2], [3], [4], [5], [6], [7].

Тема 3: Влияние факторов внешней среды на развитие микроорганизмов

Лекция

Влияние физических факторов: температуры, влажности, давления, лучистой энергии. Психрофильные; мезофильные и термофильные микроорганизмы. Механизм действия высоких и низких температур. Использование действия температур на микроорганизмы в пищевой промышленности (замораживание, охлаждение, пастеризация, стерилизация). Причины угнетения микроорганизмов при высушивании. Влияние осмотического (плазмолиз и плазмопсис) и атмосферного давления. Влияние ультрафиолетовых лучей, СВЧ- энергии, радиоактивного излучения и ультразвука. Их применение в пищевой промышленности. Влияние химических факторов. Механизм их действия. Дезинфицирующие вещества. Пищевые консерванты. Требования, предъявляемые к ним. Влияние биологических факторов. Симбиоз и антагонизм.

Основные понятия темы: влияние абиотических факторов, влияние биотических факторов, пути регулирования жизнедеятельности микроорганизмов.

Вопросы для самоконтроля:

1. Каковы особенности бактерий в фазе задержки роста?
2. В результате чего может наступить фаза отмирания?
3. Какова роль свободной воды для микроорганизмов в субстратах?
4. Перечислите группы микроорганизмов по потребности во влаге.
5. От чего зависит эффективность действия химических веществ на микроорганизмы?
6. Перечислите группы микроорганизмов по отношению к температуре.
7. От чего может изменяться термоустойчивость микроорганизмов?
8. Более устойчивы к действию УФ-лучей споры бактерий или вегетативные клетки?
9. Охарактеризуйте понятие «антибиотики».
10. Особенности применения антибиотиков в пищевой промышленности.
11. Приведите пример ограничивающего фактора для успешного применения барьерной технологии.

Литература: [1], [2], [3], [4], [5], [6], [7].

Лабораторная работа. Питательные среды

В ходе выполнения лабораторной работы изучают основы приготовления питательных сред; знакомятся с основными требованиями, предъявляемыми к питательным средам. Выполняют приготовление питательных сред, таких как - мясопептонный бульон (МПБ) или рыбопептонный бульон (РПБ); мясопептонный агар (МПА) или рыбопептонный агар (РПА); среду Сабуро; среду Кесслер; желточно-солевой агар. Формулируют вывод и оформляют отчет.

Лабораторная работа. Посев на плотные и жидкие питательные среды

В ходе выполнения лабораторной работы проводят посев в жидкую, а также на плотные питательные среды: на скошенный мясопептонный агар; уколом в столбик питательной сре-

ды; на поверхность плотной питательной среды в чашке Петри; в толщу плотной питательной среды в чашке Петри. Далее проводят выделение чистой культуры микроорганизмов: методом посева в глубине среды; по методу Дригальского. Ставят посевы на термостатирование. Затем изучают посевы микроорганизмов и определяют их культуральные признаки, готовят мазки и окрашивают их по методу Грама. Микроскопируют полученные препараты, формулируют выводы.

Литература: [1], [2], [3], [4], [5], [6], [7].

Раздел 2. Микрофлора сырья. Факторы, обуславливающие естественную защиту сырья, используемого в пищевой промышленности

Тема 4: Микрофлора плодов и овощей. Микрофлора квашеных овощей и плодов

Лекция

Микрофлора свежих плодов и овощей. Количественный и качественный состав микрофлоры свежих плодов и овощей и его изменения при хранении. Причины порчи свежих плодов и овощей и способы увеличения срока хранения. Влияние упаковки на микрофлору свежих плодов и овощей. Микробиологический контроль при реализации свежих плодов и овощей. Микрофлора квашеных овощей и плодов (бактерии молочнокислые, уксуснокислые, маслянокислые, дрожжи). Болезни плодов и овощей, вызываемые патогенной микрофлорой.

Основные понятия темы: микрофлора плодов и овощей, её качественный и количественный состав, особенности изменения; микрофлора квашеных овощей и плодов, особенности действия патогенной микрофлоры.

Вопросы для самоконтроля:

1. Перечислите характерных представителей эпифитной микрофлоры плодов и овощей.
2. Чем определяется интенсивность развития микроорганизмов в плодах и овощах?
3. Приведите примеры грибных заболеваний плодов и овощей при хранении.
4. Приведите примеры бактериальных заболеваний плодов и овощей при хранении.
5. Как можно направлять полезную биохимическую деятельность микроорганизмов в практике квашения?
6. Какова роль соли при квашении?
7. При какой температуре рекомендовано хранить квашеную продукцию, чтобы задержать развитие микроорганизмов?

Литература: [1], [2], [3], [4], [5], [6], [7].

Лабораторная работа. Биохимические свойства микроорганизмов, выделенных в чистую культуру

В ходе выполнения лабораторной работы делают посевы для определения сахаролитических, протеолитических свойств и редуцирующей способности микроорганизмов. Затем рассматривают посевы и делают их описание, формулируют вывод о биохимических свойствах изучаемого микроорганизма. Далее готовят препарат бактерий, окрашивают его по Граму и рассматривают под микроскопом, результаты фиксируют в тетрадь.

Литература: [1], [2], [3], [4], [5], [6], [7].

Тема 5: Микрофлора кулинарных изделий из сырья растительного происхождения

Лекция

Количественный и качественный состав микрофлоры кулинарных изделий из растительного сырья и его изменение при хранении. Причины порчи кулинарных изделий из растительного сырья и способы увеличения срока хранения. Влияние упаковки на кулинарные изделия из растительного сырья. Факторы, влияющие на выживаемость микроорганизмов при охлаждении. Микробиологический контроль при производстве кулинарных изделий из растительного сырья.

Основные понятия темы: микрофлора кулинарных изделий из растительного сырья, её

качественный и количественный состав, особенности изменения; выживаемость микроорганизмов, инфицирование продукции, микробиологический контроль.

Вопросы для самоконтроля:

1. От чего зависит микрофлора готовой продукции?
2. В каких случаях кулинарные изделия могут подвергаться микробной порче?
3. Перечислите факторы, влияющие на выживаемость микроорганизмов при охлаждении.
4. В какие материалы целесообразно упаковывать готовые кулинарные изделия?
5. Какие бактерии преобладают в микрофлоре кулинарно приготовленных изделий?
6. Что влияет на обсемененность микроорганизмами сырых блюд?
7. Какие профилактические мероприятия, обеспечивают выпуск доброкачественной и безопасной для здоровья потребителя пищи?

Лабораторная работа. Микробиологическое исследование муки на наличие картофельной палочки

В ходе выполнения лабораторной работы делают посев разведений суспензии муки на МПА. Затем проводят определение обсемененности муки картофельной палочкой. Формулируют вывод и оформляют отчет.

Лабораторная работа. Санитарно-микробиологический анализ кулинарных изделий

В ходе выполнения лабораторной работы используют средние пробы нескольких видов кулинарных изделий. Производят учет посева средней пробы на МПА в чашках Петри, просматривают чашки, затем выбирают чашку с изолированными колониями и проводят исследование. Сравнивают полученные результаты с санитарными требованиями к данному виду продукта. Формулируют вывод и оформляют отчет.

Литература: [1], [2], [3], [4], [5], [6], [7].

Тема 6: Основные принципы консервирования и хранения пищевых продуктов. Современные методы дезинфекции технологического оборудования, применение новых дезинфицирующих веществ

Лекция

Основные принципы консервирования и хранения пищевых продуктов. Принцип биоаза. Принцип абиоза. Современные методы уничтожения микроорганизмов в пищевых продуктах. Характеристика консервантов. Принцип анабиоза (криоанабиоз, ксероанабиоз, осмоанабиоз, наркоанабиоз). Принцип ценоанабиоза, основанный на подавлении технически вредной микрофлоры за счет создания условий для развития полезной микрофлоры.

Методы дезинфекции технологического оборудования: физические, химические и биологические. Дезинфектанты и антисептики. Характеристика моющих и дезинфицирующих веществ, используемых в пищевой промышленности. Выбор дезинфицирующих средств и способы дезинфекции различных объектов.

Основные понятия темы: принципы консервирования пищевых продуктов, методы уничтожения микроорганизмов в пищевых продуктах, особенности подавления технически вредной микрофлоры, методы дезинфекции, дезинфицирующие средства.

Вопросы для самоконтроля:

1. Какие технологические операции при подготовке продуктов к стерилизации снижают их обсемененность микробами?
2. За счет чего повышается термоустойчивость микробов во время стерилизации?
3. Приведите пример возбудителей порчи консервов.
4. Назовите показатель микробиологической стабильности консервов.
5. На чем основано дезинфицирующее действие хлорсодержащих веществ?
6. Для чего применяется дезинфекция на пищевых предприятиях?

7. От чего зависит выбор дезинфицирующего вещества?

Литература: [1], [2], [3], [4], [5], [6], [7].

Лабораторная работа. Микробиологический анализ консервов из растительного сырья

В ходе выполнения лабораторной работы проводят подготовку банки консервов к бактериологическому анализу. Далее выявляют аэробную мезофильную микрофлору, а также анаэробную мезофильную микрофлору. Формулируют вывод и оформляют отчет.

Литература: [1], [2], [3], [4], [5], [6], [7].

5 Учебно-методическое обеспечение для самостоятельной работы обучающихся

5.1. Внеаудиторная самостоятельная работа студентов

В целом внеаудиторная самостоятельная работа студента при изучении курса включает в себя следующие виды работ:

- проработка (изучение) материалов лекций;
- чтение и проработка рекомендованной основной и дополнительной литературы;
- подготовка к лабораторным занятиям;
- поиск и проработка материалов из Интернет-ресурсов, научных публикаций;
- подготовка к защите лабораторных работ;
- подготовка к текущему и итоговому (промежуточная аттестация) контролю знаний по дисциплине.

Основная доля самостоятельной работы студентов приходится на подготовку к лабораторным работам и их защите, тематика которых полностью охватывает содержание курса. Самостоятельная работа по подготовке к лабораторным работам и их защите предполагает умение работать с первичной информацией.

Самостоятельная работа по разделу 1:

Работа с конспектом лекций и рекомендованной литературой (1 и дополнительная).

Подготовка материалов к контрольному опросу по изученным темам, лабораторным занятиям, тестовым проверкам знаний, защите лабораторных работ, диалогам с преподавателем и участниками проверки знаний первого раздела.

Самостоятельная работа по разделу 2:

Работа с конспектом лекций и рекомендованной литературой (1 и дополнительная).

Подготовка материалов к контрольному опросу по изученным темам, лабораторным занятиям, тестовым проверкам знаний, защите лабораторных работ, диалогам с преподавателем и участниками проверки знаний второго раздела.

6 Фонд оценочных средств для проведения промежуточной аттестации обучающихся по дисциплине

Фонд оценочных средств для проведения промежуточной аттестации обучающихся по дисциплине «Пищевая микробиология» представлен в приложении к рабочей программе дисциплины и включает в себя:

- перечень компетенций с указанием этапов их формирования в процессе освоения образовательной программы;

- описание показателей и критериев оценивания компетенций на различных этапах их формирования, описание шкал оценивания;
- типовые контрольные задания или материалы, необходимые для оценки знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности, характеризующих этапы формирования компетенций;
- методические материалы, определяющие процедуры оценивания знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности, характеризующих этапы формирования компетенций.

Вопросы для проведения промежуточной аттестации по дисциплине

1. Основные группы микроорганизмов, встречающиеся в пищевых продуктах, и процессы ими вызываемые.
2. Характеристика дрожжей, встречающихся в производстве пищевых продуктов, их промышленное использование и роль в процессах порчи пищевых продуктов.
3. Уксуснокислые бактерии их характеристика. Положительная и отрицательная роль уксуснокислых бактерий в производстве различных пищевых продуктов.
4. Пропионовокислые бактерии их характеристика. Промышленное получение пропионовой кислоты и витамина В12. Роль пропионовокислых бактерий в формировании качества твердых сыров.
5. Виды гнилостных бактерий основные продукты аэробного и анаэробного гниения и характеристика возбудителей гниения.
6. Отрицательная роль гнилостных бактерий в производстве и хранении пищевых продуктов.
7. Микроскопические грибы. Роль микроскопических грибов в процессах порчи пищевых продуктов.
8. Патогенные микроорганизмы – возбудители пищевых инфекций. Виды пищевых инфекций. Мероприятия, направленные на предотвращение распространения инфекции через пищевые продукты.
9. Условно-патогенные микроорганизмы – возбудители пищевых отравлений. Виды пищевых отравлений. Мероприятия, направленные на предотвращение развития условно-патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах.
10. Микробиологические показатели, используемые для оценки качества пищевых продуктов.
11. Требования, предъявляемые к санитарно-показательным микроорганизмам.
12. Микрофлора зерна. Количественный, качественный состав. Хранение.
13. Микрофлора крупы. Количественный, качественный состав. Хранение.
14. Микрофлора муки. Количественный, качественный состав. Виды порчи.
15. Микрофлора хлеба: пшеничного, ржаного. Виды порчи, методы борьбы.
16. Моющие и дезинфицирующие вещества используемые в пищевой промышленности.
17. Влияние факторов внешней среды на развитие микроорганизмов.
18. Влияние физических факторов: температуры, влажности, давления, лучистой энергии.
19. Психрофильные; мезофильные и термофильные микроорганизмы.
20. Механизм действия высоких и низких температур.
21. Использование действия температур на микроорганизмы в пищевой промышленности (замораживание, охлаждение, пастеризация, стерилизация).
22. Причины угнетения микроорганизмов при высушивании.
23. Влияние осмотического (плазмолиз и плазмопсис) и атмосферного давления.
24. Влияние ультрафиолетовых лучей, СВЧ-энергии, радиоактивного излучения и ультразвука.
25. Их применение в пищевой промышленности.
26. Влияние химических факторов на развитие микроорганизмов.

27. Механизм их действия. Дезинфицирующие вещества.
28. Пищевые консерванты. Требования, предъявляемые к ним.
29. Влияние биологических факторов. Симбиоз и антагонизм.
30. Биохимические процессы, вызываемые микроорганизмами.
31. Пищевые заболевания (пищевые интоксикации и токсикоинфекции).
32. Санитарно-показательные микроорганизмы.
33. Бактерии группы кишечной палочки, сальмонеллы, стафилококк.
34. Микрофлора внешней среды.
35. Микрофлора сырья.
36. Факторы, влияющие на количественный и качественный состав микрофлоры.
37. Основные группы микроорганизмов.
38. Микрофлора свежих плодов и овощей.
39. Количественный и качественный состав микрофлоры свежих плодов и овощей и его изменения при хранении.
40. Причины порчи свежих плодов и овощей и способы увеличения срока хранения. Влияние упаковки на микрофлору свежих плодов и овощей.
41. Микробиологический контроль при реализации свежих плодов и овощей.
42. Микрофлора квашеных овощей и плодов (бактерии молочнокислые, уксуснокислые, маслянокислые, дрожжи).
43. Микрофлора крупы.
44. Микрофлора муки.
45. Микрофлора хлеба. Бактерии-возбудители порчи крупы, муки и хлеба.
46. Производство пекарских дрожжей.
47. Количественный и качественный состав микрофлоры кулинарных изделий из растительного сырья и его изменение при хранении.
48. Причины порчи кулинарных изделий из растительного сырья и способы увеличения срока хранения.
49. Влияние упаковки на кулинарные изделия из растительного сырья.
50. Факторы, влияющие на выживаемость микроорганизмов при охлаждении.
51. Микробиологический контроль при производстве кулинарных изделий из растительного сырья.
52. Болезни плодов и овощей, вызываемые патогенной микрофлорой
53. Количественный и качественный состав микрофлоры кулинарных изделий. Сроки реализации кулинарных изделий и меры, применяемые для увеличения срока их хранения.
54. Микрофлора консервов и микробиологический контроль консервного производства.
55. Микробиологический контроль консервов перед стерилизацией. Виды контроля и их периодичность. Микробиологические основы разработки режимов стерилизации.

7. Рекомендуемая литература

Основная литература

1. Введение в технологии продуктов питания: учеб. пособие/ под ред. А.П. Нечаева. — М.: ДеЛи плюс, 2013. — 720 с. (10 экз.)

Дополнительная литература

2. Мармузова Л.В. Основы микробиологии, санитарии и гигиены в пищевой промышленности: учебник. — М.: Академия, 2003. — 136 с. (10 экз.)
3. Гусев М.В. Микробиология: учебник. — М.: Академия, 2003. — 464 с. (87 экз.)
4. Нетрусов А. И. Микробиология: учебник. — М.: Академия. 2009. — 352 с. (14 экз.)

5. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. 2.3.2. Продовольственное сырье и пищевые продукты. СанПиН 2.3.2.1280-03: дополнения и изменения №2 к СанПиН 2.3.2.1078-01. — М.: Фед. центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. — 34 с. (10 экз.)

8 Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет»

6. Микробиологический контроль пищевых производств [Электронный ресурс]. — URL: <http://www.twirpx.com/files/food/quality/mcontrol/>

7. Микробиология пищевых продуктов [Электронный ресурс]. — URL: <http://biobib.ru/index.php/mikrobiologiya/obshaya-mikrobiologiya/mikrobiologiya-pishevix-produktov.html>

8. Официальный сайт издательства «Пищевая промышленность» [Электронный ресурс]. — URL: www.foodprom.ru.

9 Методические указания для обучающихся по освоению дисциплины

Методика преподавания данной дисциплины предполагает чтение лекций, проведение лабораторных занятий, групповых и индивидуальных консультаций по отдельным вопросам дисциплины. Предусмотрена самостоятельная работа студентов, а также прохождение аттестационных испытаний промежуточной аттестации.

На лекциях рассматриваются такие важные разделы микробиологии как: биологические свойства микроорганизмов, их роль в процессах порчи и сущности микробиологических процессов, протекающих при выработке пищевых продуктов.

Целью проведения лабораторных занятий является закрепление теоретических знаний студентов, полученных ими в ходе изучения дисциплины на лекциях и самостоятельно. Занятия лабораторного типа включают в себя следующие этапы: изучение теоретической части лабораторной работы; конспектирование хода выполнения лабораторной работы и проведение ее экспериментальной части; выполнение необходимых рисунков; оформление отчета о проделанной работе; защита лабораторной работы. Для подготовки к занятиям лабораторного типа и защиты выполненных лабораторных работ студенты выполняют проработку методических указаний по выполнению лабораторной работы, уделяя особое внимание целям и задачам, теоретической части и порядку выполнения лабораторной работы; конспектирование источников; работу с конспектом лекций, просмотр рекомендуемой литературы.

При изучении дисциплины используются интерактивные методы обучения, такие как:

1. Лекция:

– лекция-визуализация – подача материала осуществляется средствами технических средств обучения с кратким комментированием демонстрируемых визуальных материалов (презентаций).

2. Лабораторное занятие:

–тренинг – метод обучения и развития способностей к овладению деятельностью проведения химических лабораторных исследований. Интенсивная работа во время тренинга помогает достичь высоких результатов за короткий срок, а последующая система после тренингового сопровождения обеспечивает надежное закрепление материала

– работа в малых группах обеспечивает активную познавательную деятельность обучающихся, предусматривает распределение обязанностей между ними, исполнительную и организаторскую инициативу, актуализацию, как опыта самостоятельной деятельности, так и совместной работы по выполнению лабораторных работ, что согласуется с реалиями профессиональной деятельности будущих специалистов.

10 Курсовой проект (работа)

Выполнение курсового проекта (работы) не предусмотрено учебным планом.

11 Перечень информационных технологий, используемых при осуществлении образовательного процесса по дисциплине, включая перечень программного обеспечения и информационно-справочных систем

11.1 Перечень информационных технологий, используемых при осуществлении образовательного процесса

– электронные образовательные ресурсы, представленные в п. 8 рабочей программы;
– использование слайд-презентаций;
– интерактивное общение с обучающимися и консультирование посредством электронной почты.

11.2 Перечень программного обеспечения, используемого при осуществлении образовательного процесса

При освоении дисциплины используется лицензионное программное обеспечение:

- операционные системы Astra Linux (или иная операционная система, включенная в реестр отечественного программного обеспечения);
- комплект офисных программ Р-7 Офис (в составе текстового процессора, программы работы с электронными таблицами, программные средства редактирования и демонстрации презентаций);
- программа проверки текстов на предмет заимствования «Антиплагиат».

11.3 Перечень информационно-справочных систем

– справочно-правовая система Консультант-плюс <http://www.consultant.ru/online>
– справочно-правовая система Гарант <http://www.garant.ru/online>

12 Материально-техническое обеспечение дисциплины

Для проведения занятий лекционного типа, групповых и индивидуальных консультаций, текущего контроля и промежуточной аттестации используются учебные аудитории 6-507, 6-519 с комплектом учебной мебели. При проведении лабораторных работ используется лаборатория экологии, биологии и микробиологии – аудитория № 6-506 на 14 посадочных мест с оборудованием: микроскопы «БИОМЕД-1», приборы гигрометры ВИТ-1, ВИТ-2; комплект микропрепаратов (анатомических, зоологических, ботанических); набор по общей биологии; прибор для счета колоний; автоклав автоматический горизонтальный Tattnauer; плитки электрические; весы ВЛТЭ-150 тензометрические; водонагреватель Термекс; дистиллятор ДЭ-4М; камера цифровая - окуляр ДСМ-130 (для микроскопа); облучатель бактерицидный (рециркулятор) ОБН-2-15-01; термостат суховоздушный ТС-1/80 СПУ; шкаф суховоздушный ШС-80-01; холодильник STINOL; холодильник Pozis-149; шкаф вытяжной; инструменты (иглы препаровальные, петли микробиологические, пинцеты, лупа и др.), материалы (бинты, вата, бумага фильтрованная, трубки резиновые и др.), лабораторная посуда (чашки Петри, пробирки, пипетки, спиртовки, колбы, мензурки и др.), химические реактивы.

Для самостоятельной работы обучающихся используется кабинеты 6-522; оборудован комплект учебной мебели, двумя компьютерами с доступом в информационно-телекоммуникационную сеть «Интернет» и в электронную информационно-образовательную среду организации.

Технические средства обучения для представления учебной информации включают аудиторную доску, мультимедийное оборудование.

При изучении дисциплины используется библиотечный фонд КамчатГТУ: учебники,

учебные пособия, периодические журналы, электронный ресурс; раздаточный материал (тесты, доклады о состоянии окружающей среды, нормативно-правовые документы и др.).

Дополнения и изменения в рабочей программе

Дополнения и изменения в рабочей программе за ____/____ учебный год

В рабочую программу по дисциплине «Пищевая микробиология» для направления подготовки 19.03.04 «Технология и продукции и организация общественного питания» вносятся следующие дополнения и изменения:

Дополнения и изменения внес _____
(должность, Ф.И.О., подпись)

Рабочая программа пересмотрена и одобрена на заседании кафедры _____
«__» _____ 202__ г.

Заведующий кафедрой _____
(подпись) (Ф.И.О.)

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КАМЧАТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ФГБОУ ВО «КамчатГТУ»)

Научно-образовательный центр «Экология и природопользование»
Кафедра «Экология и природопользование»

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель департамента
«Пищевые биотехнологии»
_____ В.Б. Чмыхалова
«23» 10 2024 г.


ФОНД ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ
по дисциплине

«ПИЩЕВАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ»

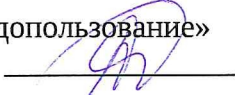
направление подготовки
19.03.04 Технология продукции и организация общественного питания

направленность (профиль):
«Технология продукции и организация общественного питания»

Петропавловск-Камчатский,
2024

Составитель фонда оценочных средств
Доцент кафедры «Экология и природопользование», к.б.н.  Авдощенко В.Г.

Фонд оценочных средств рассмотрен на заседании кафедры «Экология и природопользование»
«23» 10 2024 г., протокол № 5/1

И.о. заведующего кафедрой «Экология и природопользование»
«23» 10 2024 г.  Авдощенко В.Г.

АКТУАЛЬНО НА

2025/2026 учебный год


(подпись)

Авдощенко В.Г.

2026/2027 учебный год

(подпись)

Авдощенко В.Г.

1. Перечень компетенций с указанием этапов их формирования в процессе освоения образовательной программы

Схема формирования компетенций ОПК-2 в процессе освоения образовательной программы 19.03.04 Технология продукции и организация общественного питания									
Код дисциплины из УП	Наименование дисциплины (в соответствии с УП)	1 семес тр	2 семес тр	3 семес тр	4 семес тр	5 семес тр	6 семес тр	7 семес тр	8 семес тр
ОПК-2 способность применять основные законы и методы исследований естественных наук для решения задач профессиональной деятельности									
Б1.О.10	Математика	Э	диф з	Э					
Б1.О.11	Физика	диф з	Э						
Б1.О.12	Биология	зачет							
Б1.О.13	Основы общей и неорганической химии	Э	Э						
Б1.О.14	Введение в технологию продуктов питания		диф з						
Б1.О.15	Аналитическая химия и физико-химические методы анализа			зачет	Э				
Б1.О.16	Органическая химия			зачет	Э				
Б1.О.17	Биохимия					Э			
Б1.О.18	Физическая и коллоидная химия					Э	Э		
Б1.О.19	Пищевая химия						диф з		
Б1.О.24	Физико-химические основы и общие принципы переработки продуктов питания				Э				
Б1.О.26	Пищевая микробиология						Э		
Б2.О.01.02(Н)	Научно-исследовательская работа (получение первичных навыков научно-исследовательской работы)				диф з				
Б3.01	Подготовка к процедуре защиты и защита выпускной квалификационной работы								Защита ВКР

Таблица 1 – Паспорт ФОС

Контролируемые разделы (темы) дисциплины	Код контролируемой компетенции или ее части	Наименование оценочного средства
Раздел 1 Основные группы полезной и технически вредной микрофлоры		
Тема 1: Технически полезная микрофлора, встречающаяся в пищевых продуктах, и процессы	ОПК-2	Опрос: 3(ОПК-2)1, 3(ОПК-2)2, 3(ОПК-2)3 Выполнение и защита лаб. работ:

ею вызываемые		У(ОПК-2)1, У(ОПК-2)2; В(ОПК-2)1, В(ОПК-2)2, В(ОПК-2)3
Тема 2: Представители технически вредной микрофлоры	ОПК-2	Опрос: 3(ОПК-2)4 Выполнение и защита лаб. работ: У(ОПК-2)1, У(ОПК-2)2; В(ОПК-2)1, В(ОПК-2)2, В(ОПК-2)3
Тема 3: Патогенные и условно-патогенные микроорганизмы	ОПК-2	Опрос: 3(ОПК-2)3, 3(ОПК-2)4 Выполнение и защита лаб. работ: У(ОПК-2)1, У(ОПК-2)2; В(ОПК-2)1, В(ОПК-2)2, В(ОПК-2)3 Тест: 3(ОПК-2)1, 3(ОПК-2)2, 3(ОПК-2)3, 3(ОПК-2)4
Раздел 2 Факторы внешней среды и механизм их действия на микроорганизмы		
Тема 4: Влияние факторов внешней среды на развитие микроорганизмов	ОПК-2	Опрос: 3(ОПК-2)3, 3(ОПК-2)4 Выполнение и защита лаб. работ: У(ОПК-2)3; В(ОПК-2)1, В(ОПК-2)2, В(ОПК-2)3 Тест: 3(ОПК-2)3, 3(ОПК-2)4
Раздел 3 Микрофлора сырья растительного происхождения		
Тема 5: Микрофлора свежих и квашеных овощей и плодов	ОПК-2	Опрос: 3(ОПК-2)6 Выполнение и защита лаб. работ: У(ОПК-2)2, У(ОПК-2)4, У(ОПК-2)5; В(ОПК-2)1, В(ОПК-2)2, В(ОПК-2)3
Тема 6: Микрофлора кулинарных изделий из сырья растительного происхождения	ОПК-2	Опрос: 3(ОПК-2)6 Выполнение и защита лаб. работ: У(ОПК-2)2, У(ОПК-2)4, У(ОПК-2)5; В(ОПК-2)1, В(ОПК-2)2, В(ОПК-2)3 Тест: 3(ОПК-2)6
Раздел 4 Факторы, обуславливающие естественную защиту сырья, используемого в пищевой промышленности		
Тема 7: Основные принципы консервирования и хранения пищевых продуктов	ОПК-2	Опрос: 3(ОПК-2)5, 3(ОПК-2)6 Выполнение и защита лаб. работ: У(ОПК-2)2, У(ОПК-2)5, У(ОПК-2)6; В(ОПК-2)1, В(ОПК-2)2, В(ОПК-2)3
Тема 8: Современные методы дезинфекции технологического оборудования, применение новых дезинфицирующих веществ	ОПК-2	Опрос: 3(ОПК-2)5 Выполнение и защита лаб. работ: У(ОПК-2)2, У(ОПК-2)5, У(ОПК-2)6; В(ОПК-2)1, В(ОПК-2)3, В(ОПК-2)4 Тест: 3(ОПК-2)5, 3(ОПК-2)6

2. Описание показателей и критериев оценивания компетенций на различных этапах их формирования, описание шкал оценивания

2.1 Описание показателей и критериев оценивания компетенций на различных этапах их

формирования

Код компетенции	Планируемые результаты обучения по дисциплине	Критерии оценивания результатов обучения*				
		1	2	3	4	5
ОПК-2 способность применять основные законы и методы исследований естественных наук для решения задач профессиональной деятельности	<p>Знать:</p> <ul style="list-style-type: none"> – правила безопасности работы в микробиологической лаборатории; – основную микробиологическую посуду, инструменты, питательные среды и методы их стерилизации; – различные группы микроорганизмов, являющихся представителями полезной микрофлоры пищевых продуктов; – технически вредную микрофлору и роль ее в процессах порчи пищевых продуктов; – основы микробиологического и санитарного контроля на предприятиях отрасли; – критерии безопасности и санитарные нормы качества пищевых продуктов. 	Не сформированы знания в отношении пищевой микробиологии	Фрагментарные знания в области пищевой микробиологии	Неполные представления о вопросе	Определенные пробелы в знаниях	Сформированы системные представления о пищевой микробиологии
	<p>Уметь:</p> <ul style="list-style-type: none"> готовить и микроскопировать препараты микроорганизмов; проводить микробиологическое исследование пищевых продуктов; применять полученные знания при изучении специальных дисциплин и при последующей самостоятельной работе на производстве; работать с ГОСТами и инструкциями; объективно оценивать качество сырья и продуктов по микробиологическим показателям; применять полученные знания для хранения сырья, создания прогрессивных технологических схем его переработки. 	Отсутствие умений. Данный результат указывает на несформированность порогового уровня умений	Фрагментарные умения	Несистемное использование знаний	Несистематическое использование умений	Сформированное умение использовать полученные знания
	<p>Владеть:</p> <ul style="list-style-type: none"> навыками обсуждения и интерпретации экспериментальных данных; навыками идентификации микроорганизмов; навыками информационного поиска по вопросам микробиологии пищевых продуктов; навыками проведения санитарно-микробиологического 	Отсутствие навыков в области пищевой микробиологии	Фрагментарные навыки в области пищевой микробиологии	В целом успешное, но не систематическое применение навыков.	В целом успешное, но содержащее определенные пробелы применения навыков.	Успешное и систематическое применение навыков.

контроля на предприятиях пищевой промышленности.					
--	--	--	--	--	--

- *1 - Неудовлетворительная оценка результатов обучения. Отсутствие знаний, умений, навыков. Данный результат указывает на несформированность порогового уровня знаний, умений, навыков.
- 2 - Неудовлетворительная оценка результатов обучения. Фрагментарные знания, умения, навыки.
- 3 - Удовлетворительная оценка результатов обучения. Несистематическое использование знаний, умений, навыков.
- 4 - Удовлетворительная оценка результатов обучения. Определенные пробелы. В целом, успешное использование знаний, умений, навыков.
- 5 - Удовлетворительная оценка результатов обучения. Успешное и систематическое применение знаний, умений, навыков

2.2 Описание шкал оценивания

Формы контроля	Шкала оценивания
устный опрос	<p>Оценка «отлично»: ответы на поставленные вопросы излагаются четко, логично, последовательно и не требуют дополнительных пояснений, делаются обоснованные выводы, демонстрируются глубокие знания теоретических вопросов, соблюдаются нормы литературной речи.</p> <p>Оценка «хорошо»: ответы на поставленные вопросы излагаются систематизировано и последовательно, материал излагается уверенно, демонстрируется умение анализировать материал, однако не все выводы носят аргументированный и доказательный характер, соблюдаются нормы литературной речи, обучающийся демонстрирует хороший уровень освоения материала.</p> <p>Оценка «удовлетворительно»: допускаются нарушения в последовательности изложения ответов на поставленные вопросы, демонстрируются поверхностные знания вопроса, имеются затруднения с выводами, допускаются нарушения норм литературной речи.</p> <p>Оценка «неудовлетворительно»: материал излагается непоследовательно, сбивчиво, не представляет определенной системы знаний по дисциплине, имеются заметные нарушения норм литературной речи, обучающийся допускает существенные ошибки в ответах на вопросы, не ориентируется в понятийном аппарате.</p>
индивидуальные устные опросы по разделам дисциплины	<p>Оценка «отлично»: ответы на поставленные вопросы по разделу излагаются четко, логично, последовательно и не требуют дополнительных пояснений, делаются обоснованные выводы, демонстрируются глубокие знания теоретических вопросов, соблюдаются нормы литературной речи.</p> <p>Оценка «хорошо»: ответы на поставленные вопросы по разделу излагаются систематизировано и последовательно, материал излагается уверенно, демонстрируется умение анализировать материал, однако не все выводы носят аргументированный и доказательный характер, соблюдаются нормы литературной речи, обучающийся демонстрирует хороший уровень освоения материала.</p> <p>Оценка «удовлетворительно»: допускаются нарушения в последовательности изложения ответов на поставленные по разделу вопросы, демонстрируются поверхностные знания вопросов, изученных в данном разделе, имеются затруднения с выводами, допускаются нарушения норм литературной речи.</p> <p>Оценка «неудовлетворительно»: материал излагается непоследовательно, сбивчиво, не представляет определенной системы знаний по разделу дисциплины, имеются заметные нарушения норм литературной речи, обучающийся допускает существенные ошибки в ответах на вопросы, не ориентируется в понятийном аппарате.</p>
решение заданий в тестовой форме	Для оценивания результатов тестирования возможно использовать следующие критерии оценивания:

	<ul style="list-style-type: none"> - правильность ответа или выбора ответа. - скорость прохождения теста. - наличие правильных ответов во всех проверяемых темах (дидактических единицах) теста, <p>Общее количество вопросов принимается за 100%, оценка выставляется по значению соотношения правильных ответов к общему количеству вопросов в процентах.</p> <p>Оценка «отлично» - 85–100% правильных ответов; Оценка «хорошо» - 70–84% правильных ответов; Оценка «удовлетворительно» - 55–69% правильных ответов; Оценка «неудовлетворительно» - 54% и менее правильных ответов;</p>
<p>выполнение и защита лабораторных работ</p>	<p>Оценка «отлично» выставляется, если лабораторная работа выполнена в полном объеме, правильно, с соблюдением необходимой последовательности и правил работы в лаборатории. Обучающийся работал полностью самостоятельно, показал отличные владения навыками применения полученных знаний и умений при решении профессиональных задач в рамках усвоенного теоретического материала. Отчет по лабораторной работе выполнен в соответствии с требованиями, предъявляемые к данному виду работ, в нем приведены точно выполненные расчеты результатов определений и корректно сформулированные выводы. При защите лабораторной работы обучающийся демонстрирует знание методики определения, умение объяснить полученные результаты, полно и правильно отвечает на все контрольные вопросы;</p> <p>Оценка «хорошо» выставляется, если лабораторная работа выполнена в полном объеме, правильно, с соблюдением необходимой последовательности и правил работы в лаборатории. Обучающийся работал полностью самостоятельно, показал хорошее владение навыками применения полученных знаний и умений при решении профессиональных задач в рамках усвоенного теоретического материала. Отчет по лабораторной работе выполнен с некоторой небрежностью, в нем приведены расчеты результатов определений, выполненные с небольшими неточностями и не совсем корректно сформулированные выводы. При защите лабораторной работы обучающийся демонстрирует знание методики определения, умение объяснить полученные результаты, отвечает на большинство контрольных вопросов;</p> <p>Оценка «удовлетворительно» выставляется, если обучающийся затрачивает на выполнение лабораторной работы больше отведенного времени, при этом он показывает удовлетворительный уровень знаний теоретического материала, но испытывает затруднение при самостоятельной экспериментальной работе, что приводит к неточностям в результатах определения. При оформлении отчета допущены существенные недостатки. При защите лабораторной работы обучающийся демонстрирует слабое знание методики определения, не может полностью объяснить полученные результаты, при ответах на контрольные вопросы допускает много неточностей;</p> <p>Оценка «неудовлетворительно» выставляется в следующих случаях:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Результаты выполненной лабораторной работы не позволяют сделать правильных выводов и полностью расходятся с поставленной целью. Обучающийся показывает плохое знание теоретического материала и отсутствие необходимых умений. Руководство и помощь со стороны преподавателя оказываются неэффективны в связи плохой подготовкой обучающегося; 2. Лабораторная работа не выполнена.
<p>экзамен</p>	<p>Оценка «отлично» выставляется, если обучающийся показывает всесторонние и глубокие знания программного материала, знание основной и дополнительной литературы; последовательно и четко отвечает на вопросы билета и дополнительные вопросы; уверенно ориентируется в проблемных ситуациях; демонстрирует способность применять теоретические знания для анализа практических ситуаций, делать правильные выводы, проявляет</p>

	<p>творческие способности в понимании, изложении и использовании программного материала; подтверждает полное освоение компетенций, предусмотренных программой.</p> <p>Оценка «хорошо» выставляется, если обучающийся показывает полное знание программного материала, основной и дополнительной литературы; дает полные ответы на теоретические вопросы, допуская некоторые неточности; правильно применяет теоретические положения к оценке практических ситуаций; демонстрирует хороший уровень освоения материала и в целом подтверждает освоение компетенций, предусмотренных программой.</p> <p>Оценка «удовлетворительно» выставляется, если обучающийся показывает знание основного материала в объеме, необходимом для предстоящей профессиональной деятельности; при ответе на вопросы не допускает грубых ошибок, но испытывает затруднения в последовательности их изложения; не в полной мере демонстрирует способность применять теоретические знания для анализа практических ситуаций, подтверждает освоение компетенций, предусмотренных программой на минимально допустимом уровне.</p> <p>Оценка «неудовлетворительно» выставляется, если обучающийся имеет существенные пробелы в знаниях основного учебного материала по разделу; не способен аргументировано и последовательно его излагать, допускает грубые ошибки в ответах, неправильно отвечает на задаваемые преподавателем вопросы или затрудняется с ответом; не подтверждает освоение компетенций, предусмотренных программой.</p>
--	---

Итоговое оценивание обучающегося по дисциплине «Пищевая микробиология»

Для оценки качества подготовки студента по дисциплине в целом составляется рейтинг – интегральная оценка результатов всех видов деятельности студента, осуществляемых в процессе ее изучения.

Промежуточная аттестация проводится по окончании изучения дисциплины во время зачетно-экзаменационной сессии, в соответствии с рабочим учебным планом по направлению подготовки – в форме экзамена.

Преподаватель на вводной лекции (первом занятии) знакомит обучающихся группы с программой учебной дисциплины, порядком определения количества ЗЕ, графиком, формами и процедурой прохождения текущего контроля, а также примерными вопросами для подготовки к промежуточной аттестации.

Промежуточная аттестация – это форма контроля теоретических знаний, полученных студентом в процессе изучения всей учебной дисциплины или ее части, и умения их применять в практической деятельности. Он должен учитывать выполнение студентом всех видов работ, предусмотренных программой дисциплины, в том числе самостоятельную работу.

Показатели, критерии оценки сформированности компетенции, шкала оценивания результатов освоения компетенций по уровням освоения представлены в таблице.

Уровень освоения	Критерии освоения	Показатели и критерии оценки сформированности компетенции	Шкала оценивания (традиционная оценка)
Продвинутый	<i>Компетенции сформированы. Демонстрируется высокий уровень самостоятельности, высокая адаптивность практического навыка</i>	Теоретическое содержание курса освоено полностью, без пробелов необходимые практические навыки работы с освоенным материалом сформированы, все предусмотренные программой обучения учебные задания выполнены, качество их выполнения оценено на «отлично». Обучаемый демонстрирует способность к полной самостоятельности (допускаются консультации с преподавателем по сопутствующим вопросам) в	«отлично»/ зачтено

		выборе способа решения неизвестных или нестандартных заданий в рамках учебной дисциплины с использованием знаний, умений и навыков , полученных как в ходе освоения данной учебной дисциплины, так и смежных дисциплин.	
Базовый	<i>Компетенции сформированы.</i> Демонстрируется достаточный уровень самостоятельности устойчивого практического навыка	Теоретическое содержание курса освоено полностью, без пробелов необходимые практические навыки работы с освоенным материалом сформированы недостаточно, все предусмотренные программой обучения учебные задания выполнены, качество выполнения ни одного из них не оценено минимальной оценкой, некоторые виды заданий выполнены с несущественными ошибками. Качество выполнения заданий оценено преимущественно на «хорошо». Способность обучающегося продемонстрировать самостоятельное применение знаний, умений и навыков при решении заданий, аналогичных тем, которые представлял преподаватель при потенциальном формировании компетенции, подтверждает наличие сформированной компетенции, причем на более высоком уровне	«хорошо»/зачтено
Пороговый	<i>Компетенции сформированы.</i> Демонстрируется недостаточный уровень самостоятельности практического навыка	Теоретическое содержание курса освоено частично, но пробелы не носят существенного характера, необходимые практические навыки работы с освоенным материалом в основном сформированы, большинство предусмотренных программой обучения учебных заданий выполнено, некоторые из выполненных заданий, возможно, содержат ошибки. Качество выполнения заданий оценено преимущественно на «удовлетворительно». Если обучаемый демонстрирует самостоятельность в применении знаний, умений и навыков к решению учебных заданий в полном соответствии с образцом, данным преподавателем, по заданиям, решение которых было показано преподавателем, следует считать, что компетенция сформирована, но ее уровень недостаточно высок.	«удовлетворительно»/зачтено
Низкий	<i>Компетенции не сформированы</i> Демонстрируется отсутствие или фрагментарное наличие самостоятельности и практического навыка	Теоретическое содержание курса не освоено, необходимые практические навыки работы с освоенным материалом не сформированы, выполненные учебные задания содержат грубые ошибки. Неспособность обучающегося самостоятельно продемонстрировать наличие знаний при решении заданий, которые были представлены преподавателем вместе с образцом их решения, отсутствие самостоятельности в применении умения к использованию методов освоения учебной дисциплины и неспособность самостоятельно проявить навык повторения решения поставленной задачи по стандартному образцу свидетельствуют об отсутствии сформированной компетенции.	«неудовлетворительно»/не зачтено

3. Типовые контрольные задания или материалы, необходимые для оценки знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности, характеризующих этапы формирования компетенций

3.1. Задания для оценивания результатов обучения в виде знаний

Вопросы для обсуждения:

Тема 1: Технически полезная микрофлора, встречающаяся в пищевых продуктах, и процессы ею вызываемые

1. Молочнокислые бактерии.
2. Дрожжи.
3. Уксуснокислые бактерии, их характеристика.
4. Пропионовокислые бактерии, их характеристика.
5. Молочнокислое брожение: гомо- и гетероферментативное, спиртовое, пропионовокислое брожение. Характеристика возбудителей всех видов брожения
6. Промышленное получение молочной кислоты и ее использование в производстве пищевых продуктов.
7. Использование молочнокислых бактерий и их роль в процессах порчи пищевых продуктов.
8. Химизм спиртового и уксуснокислого и пропионового кислого брожения.
9. Характеристика дрожжей, встречающихся в производстве пищевых продуктов, их промышленное использование и роль в процессах порчи пищевых продуктов.

Тема 2: Представители технически вредной микрофлоры

1. Гнилостные бактерии. Основные продукты аэробного и анаэробного гниения и характеристика возбудителей гниения.
2. Отрицательная роль гнилостных бактерий в производстве и хранении пищевых продуктов.
3. Микроскопические грибы. Роль микроскопических грибов в процессах порчи пищевых продуктов.
4. Использование микроскопических грибов в производстве органических кислот, мягких сыров.

Тема 3: Патогенные и условно-патогенные микроорганизмы

1. Патогенные микроорганизмы – возбудители пищевых инфекций. Их характеристика.
2. Химический состав и свойства микробных токсинов.
3. Виды пищевых инфекций.
4. Мероприятия, направленные на предотвращение распространения инфекций через пищевые продукты.
5. Мероприятия, направленные на предотвращение развития условно-патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах.

Тема 4: Влияние факторов внешней среды на развитие микроорганизмов

1. Влияние физических факторов: температуры, влажности, давления, лучистой энергии. Психрофильные; мезофильные и термофильные микроорганизмы.
2. Механизм действия высоких и низких температур.
3. Использование действия температур на микроорганизмы в пищевой промышленности (замораживание, охлаждение, пастеризация, стерилизация).
4. Причины угнетения микроорганизмов при высушивании.
5. Влияние осмотического (плазмолиз и плазмопсис) и атмосферного давления.
6. Влияние ультрафиолетовых лучей, СВЧ- энергии, радиоактивного излучения и ультразвука. Их применение в пищевой промышленности.
7. Влияние химических факторов. Механизм их действия. Дезинфицирующие вещества. Пищевые консерванты. Требования, предъявляемые к ним.
8. Влияние биологических факторов. Симбиоз и антагонизм.

Тема 5: Микрофлора свежих и квашеных овощей и плодов

1. Микрофлора свежих плодов и овощей. Количественный и качественный состав микрофлоры свежих плодов и овощей и его изменения при хранении.
2. Причины порчи свежих плодов и овощей и способы увеличения срока хранения. Влияние упаковки на микрофлору свежих плодов и овощей.
3. Микробиологический контроль при реализации свежих плодов и овощей.
4. Микрофлора квашеных овощей и плодов (бактерии молочнокислые, уксуснокислые, маслянокислые, дрожжи).
5. Болезни плодов и овощей, вызываемые патогенной микрофлорой.

Тема 6: Микрофлора кулинарных изделий из сырья растительного происхождения

1. Количественный и качественный состав микрофлоры кулинарных изделий из растительного сырья и его изменение при хранении.
2. Причины порчи кулинарных изделий из растительного сырья и способы увеличения срока хранения.
3. Влияние упаковки на кулинарные изделия из растительного сырья. Факторы, влияющие на выживаемость микроорганизмов при охлаждении.
4. Микробиологический контроль при производстве кулинарных изделий из растительного сырья.

Тема 7: Основные принципы консервирования и хранения пищевых продуктов

1. Основные принципы консервирования и хранения пищевых продуктов. Принцип биоза. Принцип абиоза.
2. Современные методы уничтожения микроорганизмов в пищевых продуктах.
3. Характеристика консервантов.
4. Принцип анабиоза (криоанабиоз, ксероанабиоз, осмоанабиоз, наркоанабиоз).
5. Принцип ценоанабиоза, основанный на подавлении технически вредной микрофлоры за счет создания условий для развития полезной микрофлоры.

Тема 8: Современные методы дезинфекции технологического оборудования, применение новых дезинфицирующих веществ

1. Методы дезинфекции технологического оборудования: физические, химические и биологические.
2. Дезинфектанты и антисептики.
3. Характеристика моющих и дезинфицирующих веществ, используемых в пищевой промышленности.
4. Выбор дезинфицирующих средств и способы дезинфекции различных объектов.

Тестовые задания

1. Бактерии являются
 - а) эукариотами,
 - б) прокариотами,
 - в) неклеточными организмами.
2. У бактерий процесс спорообразования является
 - а) способом размножения,
 - б) способом сохранения вида в неблагоприятных условиях среды,
 - в) способом движения.
3. Анатомическую целостность клетки обеспечивает
 - а) цитоплазматическая мембрана,
 - б) цитоплазма,
 - в) клеточная стенка.

4. Процесс спорообразования у бактерий

- а) обратимый,
- б) необратимый,
- в) прерывистый.

5. Вирусы

- а) это строгие внутриклеточные паразиты,
- б) способны размножаться как внутри клеток, так и вне клеток,
- в) размножатся вне организмов.

6. Все палочковидные формы, образующие споры, называются

- а) бактериями,
- б) бациллами,
- в) вибрионами.

7. Ферменты по своей природе являются

- а) липидами,
- б) углеводами,
- в) белками.

8. Микроорганизмы, которые могут жить как в присутствии, так и в отсутствии кислорода являются:

- а) аэробами,
- б) анаэробами,
- в) факультативными.

9. Психрофильные бактерии развиваются при температуре:

- а) от точки замерзания среды до 30-35 °С,
- б) от 5-10 до 45-50 °С,
- в) от 30-35 до 80 °С.

10. Под воздействием высоких температур микроорганизмы погибают в результате:

- а) механического разрыва клеток,
- б) денатурации белка и обезвоживания,
- в) от других причин.

11. Для развития большинства плесневых грибов наиболее благоприятна среда:

- а) со значением рН 3-5,
- б) со значением рН 7,0-7,3,
- в) со значением рН 1-2.

12. Взаимоотношение двух микроорганизмов, когда один из них полностью подавляет развитие другого, называется:

- а) комменсализм,
- б) антагонизм,
- в) паразитизм.

13. Технологические операции, способствующие замедлению деятельности микроорганизмов на продукции (отметьте все верные варианты):

- а) мойка,
- б) охлаждение,
- в) порционирование.

14. На выживаемость микроорганизмов при замораживании влияет:

- а) Исходная обсемененность продукта,
- б) температура замораживания,
- в) изменение рН.

15. Микроорганизмы, которые не растут в отсутствие соли:

- а) галлофобы,
- б) облигатные галлофилы,
- в) факультативные галлофилы.

16. При производстве маринованной продукции уксусно-солевой раствор (2–6% уксуса и 6–8% соли):

- а) задерживает размножение лактобацилл,
- б) уничтожает лактобацилл,
- в) способствует развитию лактобацилл.

17. Дополнительный микробиологический контроль вспомогательных материалов при производстве консервов включает определение (указать верные положения):

- а) термофильных аэробных микроорганизмов,
- б) термофильных анаэробных микроорганизмов,
- в) мезофильных аэробных микроорганизмов.

18. Бактерицидные вещества, образующиеся в пряностях и некоторых овощах, называются:

- а) антисептиками,
- б) антибиотиками,
- в) фитонцидами.

19. Порча овощей при хранении выражается в (привести верные положения):

- а) скисании,
- б) плесневении,
- в) гниении.

20. В процессе маринования бактерицидное действие на микрофлору овощей оказывают вещества, содержащиеся в рассоле:

- а) перец,
- б) соль,
- в) уксус.

21. Фактором, влияющим на уничтожение жизнеспособной микрофлоры при стерилизации кипячением, является:

- а) высокое содержание поваренной соли,
- б) специи,
- в) действие высоких температур.

22. Возбудителем бомбажа пресервов является:

- а) *Staphylococcus aureus*,
- б) *Micrococcus roseus*,
- в) *Clostridium perfringens*.

23. Наиболее требовательны к наличию влаги в среде:

- а) мезофиты,

- б) гидрофиты,
- в) ксерофиты.

24. Наиболее распространенным видом порчи муки является:

- а) прокисание
- б) прогоркание
- в) плесневение
- г) вспучивание

25. Свойство, характерное для муки, – это:

- А) лежкость
- Б) гигроскопичность
- В) термостойкость
- Г) влагостойкость

26. Показатель, по которому оценивается свежесть яиц, – это:

- а) размер воздушной камеры
- б) цвет скорлупы
- в) размер
- г) характерные вкрапления

27. Микрофлора, попавшая в яйцо при его формировании, относится к типу загрязнения:

- а) экзогенному
- б) эндогенному
- в) патогенному

28. Для уничтожения возбудителей инфекций, яйца всех видов птиц рекомендуется выдерживать в кипящей воде:

- а) 1–5 мин
- б) 6–10 мин
- в) 13–14 мин
- г) не менее 20 мин

29. Не допускается использование в хлебопекарном производстве яиц:

- а) с загрязненной скорлупой
- б) с битой скорлупой
- в) водоплавающих птиц
- г) с патогенной микрофлорой

30. Вредные микробы участвуют в процессе:

- а) гниения
- б) производства сыра
- в) квашения капусты
- г) соления огурцов

3.2. Задания для оценивания результатов обучения в виде умений (У) и навыков (владений) (В)

Выполнение лабораторных работ

Лабораторная работа 1 Микробиологическая лаборатория и правила работы в ней.
Устройство микроскопа и его использование в микробиологической практике.

Лабораторная работа 2 Дезинфекция и стерилизация.

Лабораторная работа 3 Приготовление препаратов микроорганизмов.

Лабораторная работа 4 Питательные среды.

Лабораторная работа 5. Посев микроорганизмов на плотные и жидкие питательные среды.

Лабораторное занятие 6. Определение количества бактерий на поверхности оборудования, руках методом счета колоний.

Лабораторное занятие 7. Микробиологическое исследование муки на наличие картофельной палочки.

Лабораторное занятие 8. Санитарно-микробиологический анализ продуктов из растительного сырья.

Лабораторное занятие 9. Микробиологический анализ консервов из растительного сырья.

4. Перечень вопросов к промежуточной аттестации

1. Основные группы микроорганизмов, встречающиеся в пищевых продуктах, и процессы ими вызываемые.

2. Характеристика дрожжей, встречающихся в производстве пищевых продуктов, их промышленное использование и роль в процессах порчи пищевых продуктов.

3. Уксуснокислые бактерии их характеристика. Положительная и отрицательная роль уксуснокислых бактерий в производстве различных пищевых продуктов.

4. Пропионовокислые бактерии их характеристика. Промышленное получение пропионовой кислоты и витамина В12. Роль пропионовокислых бактерий в формировании качества твердых сыров.

5. Виды гнилостных бактерий основные продукты аэробного и анаэробного гниения и характеристика возбудителей гниения.

6. Отрицательная роль гнилостных бактерий в производстве и хранении пищевых продуктов.

7. Микроскопические грибы. Роль микроскопических грибов в процессах порчи пищевых продуктов.

8. Патогенные микроорганизмы – возбудители пищевых инфекций. Виды пищевых инфекций. Мероприятия, направленные на предотвращение распространения инфекции через пищевые продукты.

9. Условно-патогенные микроорганизмы – возбудители пищевых отравлений. Виды пищевых отравлений. Мероприятия, направленные на предотвращение развития условно-патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах.

10. Микробиологические показатели, используемые для оценки качества пищевых продуктов.

11. Требования, предъявляемые к санитарно-показательным микроорганизмам.

12. Микрофлора зерна. Количественный, качественный состав. Хранение.

13. Микрофлора крупы. Количественный, качественный состав. Хранение.

14. Микрофлора муки. Количественный, качественный состав. Виды порчи.

15. Микрофлора хлеба: пшеничного, ржаного. Виды порчи, методы борьбы.

16. Моющие и дезинфицирующие вещества, используемые в пищевой промышленности.

17. Влияние факторов внешней среды на развитие микроорганизмов.

18. Влияние физических факторов: температуры, влажности, давления, лучистой энергии.

19. Психрофильные; мезофильные и термофильные микроорганизмы.

20. Механизм действия высоких и низких температур.

21. Использование действия температур на микроорганизмы в пищевой промышленности (замораживание, охлаждение, пастеризация, стерилизация).

22. Причины угнетения микроорганизмов при высушивании.

23. Влияние осмотического (плазмолиз и плазмопсис) и атмосферного давления.

24. Влияние ультрафиолетовых лучей, СВЧ- энергии, радиоактивного излучения и ультразвука.

25. Их применение в пищевой промышленности.
26. Влияние химических факторов на развитие микроорганизмов.
27. Механизм их действия. Дезинфицирующие вещества.
28. Пищевые консерванты. Требования, предъявляемые к ним.
29. Влияние биологических факторов. Симбиоз и антагонизм.
30. Биохимические процессы, вызываемые микроорганизмами.
31. Пищевые заболевания (пищевые интоксикации и токсикоинфекции).
32. Санитарно-показательные микроорганизмы.
33. Бактерии группы кишечной палочки, сальмонеллы, стафилококк.
34. Микрофлора внешней среды.
35. Микрофлора сырья.
36. Факторы, влияющие на количественный и качественный состав микрофлоры.
37. Основные группы микроорганизмов.
38. Микрофлора свежих плодов и овощей.
39. Количественный и качественный состав микрофлоры свежих плодов и овощей и его изменения при хранении.
40. Причины порчи свежих плодов и овощей и способы увеличения срока хранения. Влияние упаковки на микрофлору свежих плодов и овощей.
41. Микробиологический контроль при реализации свежих плодов и овощей.
42. Микрофлора квашеных овощей и плодов (бактерии молочнокислые, уксуснокислые, маслянокислые, дрожжи).
43. Микрофлора крупы.
44. Микрофлора муки.
45. Микрофлора хлеба. Бактерии-возбудители порчи крупы, муки и хлеба.
46. Производство пекарских дрожжей.
47. Количественный и качественный состав микрофлоры кулинарных изделий из растительного сырья и его изменение при хранении.
48. Причины порчи кулинарных изделий из растительного сырья и способы увеличения срока хранения.
49. Влияние упаковки на кулинарные изделия из растительного сырья.
50. Факторы, влияющие на выживаемость микроорганизмов при охлаждении.
51. Микробиологический контроль при производстве кулинарных изделий из растительного сырья.
52. Болезни плодов и овощей, вызываемые патогенной микрофлорой
53. Количественный и качественный состав микрофлоры кулинарных изделий. Сроки реализации кулинарных изделий и меры, применяемые для увеличения срока их хранения.
54. Микрофлора консервов и микробиологический контроль консервного производства.
55. Микробиологический контроль консервов перед стерилизацией. Виды контроля и их периодичность. Микробиологические основы разработки режимов стерилизации.

5. Методические материалы, определяющие процедуры оценивания знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности, характеризующих этапы формирования компетенций

По дисциплине предусмотрены следующие формы контроля качества подготовки:

- текущий (осуществление контроля за всеми видами аудиторной и внеаудиторной деятельности обучающегося с целью получения первичной информации о ходе усвоения отдельных элементов содержания дисциплины);
- промежуточный (оценивается уровень и качество подготовки по конкретным разделам дисциплины).
- контроль самостоятельной работы студента.

Результаты текущего и промежуточного контроля качества выполнения студентом запланированных видов деятельности по усвоению учебной дисциплины являются показателем качества работы обучающего за время изучения дисциплины.

Итоговый контроль проводится в форме промежуточной аттестации – экзамена.

Текущий контроль успеваемости предусматривает оценивание хода освоения дисциплины, промежуточная аттестация обучающихся – оценивание результатов обучения по дисциплине, в том числе посредством испытания в форме экзамена.

Оценивание знаний, умений и навыков по учебной дисциплине «Пищевая микробиология» осуществляется посредством использования следующих видов оценочных средств:

- устные опросы;
- индивидуальные устные опросы по разделам (модулям) дисциплины (промежуточный контроль знаний);
- решение заданий в тестовой форме;
- выполнение и защита лабораторных работ;
- экзамен.

Опросы

Устные опросы проводятся во время лабораторных занятий и при проведении промежуточного контроля знаний по разделам (модулям) дисциплины.

Вопросы опроса, проводимого во время лабораторных занятий, не должны выходить за рамки объявленной для данного занятия темы. Устные опросы необходимо строить так, чтобы вовлечь в тему обсуждения максимальное количество обучающихся в группе, проводить параллели с уже пройденным учебным материалом данной дисциплины и смежными курсами, находить удачные примеры из современной действительности, что увеличивает эффективность усвоения материала на ассоциациях. Основные вопросы для устного опроса доводятся до сведения студентов на предыдущем лабораторном занятии.

Индивидуальные устные блиц-опросы (по форме «вопрос-ответ») по разделам (модулям) дисциплины проводятся с целью определения степени усвоения теоретического материала и понятийного аппарата по всему разделу (модулю) дисциплины. Примерный перечень вопросов для индивидуального устного блиц-опроса представлены в рабочей программе дисциплины и доводятся до сведения студентов до начала курса.

При оценке опросов анализу подлежит точность формулировок, связность изложения материала, обоснованность суждений, опора на методические материалы.

Решение заданий в тестовой форме

Проводится периодически в течение изучения дисциплины. Каждому студенту отводится на тестирование по 1 минуте на каждое задание. Оценка результатов тестирования производится преподавателем, результат выдается немедленно по окончании теста, преподаватель комментирует правильные ответы. До окончания теста студент может еще раз просмотреть все свои ответы на задания и при необходимости внести коррективы. При прохождении тестирования пользоваться конспектами лекций, учебниками, и иными материалами не разрешено.

Выполнение и защита лабораторных работ

Лабораторные работы проводятся в рамках тем (разделов), наиболее значимых в формировании практических (профессиональных) компетенций. Они выполняются индивидуально каждым обучающимся на основе разработанных методических указаний с использованием специального оборудования, аппаратуры и химических реактивов. На каждую лабораторную работу выделяется определенное количество часов, прописанное в рабочей программе дисциплины, в пределах которого обучающийся обязан ее выполнить. Лабораторные работы являются средством применения и реализации полученных обучающимся теоретических знаний, умений и навыков в ходе выполнения учебно-практической исследовательской задачи, связанной с получением конкретного значимого результата с помощью реальных средств

деятельности. При выполнении лабораторных работ выявляются способности обучающегося получать новые знания в процессе практической деятельности, обобщать, систематизировать и фиксировать их.

Защита лабораторной работы проводится индивидуально каждым обучающимся после ее выполнения на основе письменного отчета при условии полного соблюдения требований к его оформлению. Защита работы проводится в виде опроса, который позволяет оценить умение и владение обучающегося излагать суть поставленной задачи, самостоятельно применять стандартные методы решения поставленной задачи с использованием имеющейся лабораторной базы, проводить анализ полученного результата работы.

Экзамен

Промежуточная аттестация по дисциплине «Пищевая микробиология» завершает изучение курса и проходит в виде экзамена. Экзамен проводится согласно расписанию зачетно-экзаменационной сессии. До экзамена не допускаются студенты, не сдавшие хотя бы одну из текущих аттестаций (индивидуальный устный блиц-опрос по разделу дисциплины). Экзамен может быть выставлен автоматически по результатам текущего и промежуточного контроля знаний и достижений, продемонстрированных студентом на лабораторных занятиях, при условии успешного выполнения самостоятельной работы. Фамилии студентов, получивших экзамен автоматически, объявляются в день проведения экзамена до начала промежуточной аттестации.

До начала экзамена все студенты группы размещаются в аудитории по одному человеку за столом. Экзамен принимает лектор. Время подготовки ответа при сдаче экзамена в устной форме должно составлять не менее 30 минут (по желанию обучающегося ответ может быть досрочным). Время ответа – не более 15 минут.

Проведение экзамена состоит из двух этапов:

1. Ответ на теоретические вопросы билета.
2. Ответ на дополнительные вопросы преподавателя по курсу дисциплины.

По итогам всех этапов и результатам текущей успеваемости выставляется итоговая отметка.

Преподаватель вправе повысить получившееся значение, основываясь на результатах текущей успеваемости студента и его работы на лабораторных занятиях. Таким образом, оценка знаний студента на экзамене носит комплексный характер и определяется его:

- ответом на экзамене;
- оценкой самостоятельной работы;
- оценками, полученными обучающимися по итогам лабораторных занятий, решением тестовых заданий, опросов и т.д.

Основой для определения оценки служит уровень усвоения обучающимися материала, предусмотренного рабочей программой. Результаты прохождения экзамена объявляются всей группе.

В случае неудовлетворительного результата испытания назначается день и время повторного (по графику ликвидации задолженностей). Присутствие посторонних лиц в ходе проведения аттестационных испытаний без разрешения ректора или проректора не допускается (за исключением работников университета, выполняющих контролирующие функции в соответствии со своими должностными обязанностями). В случае отсутствия ведущего преподавателя аттестационные испытания проводятся преподавателем, назначенным письменным распоряжением декана факультета.

Инвалиды и лица с ограниченными возможностями здоровья, допускаются на аттестационные испытания в сопровождении ассистентов-сопровождающих.

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Камчатский государственный технический университет»

Кафедра «Экология и природопользование»

Т.Н. Королёва, Л.В. Ромейко

ПИЩЕВАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

*Лабораторный практикум
для студентов очной и заочной форм обучения*

Петропавловск-Камчатский
2021

Чмыхалова В.Б.
К.б.н., доцент, зав.кафедрой ТПП
ФГБОУ ВО «КамчатГТУ»

Королёва Т.Н., **Л.В. Ромейко**

Пищевая микробиология: Лабораторный практикум для студентов очной и заочной форм обучения. / Т.Н. Королёва. – Петропавловск- Камчатский: КамчатГТУ, 2021. – 111 с.

Лабораторный практикум составлен в соответствии с требованиями к обязательному минимуму содержания основной образовательной программы для студентов.

Лабораторный практикум рассмотрен и утвержден на заседании учебно-методического совета КамчатГТУ (протокол № 4 от 01.12.2021 г.)

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
Микробиологическая лаборатория и правила работы в ней.	4
Раздел 1. Основные группы микрофлоры, факторы внешней среды и механизм их действия на микроорганизмы.....	6
Лабораторная работа № 1. Устройство микроскопа и его использование в микробиологической практике	7
Лабораторная работа № 2. Дезинфекция и стерилизация	22
Лабораторная работа №3. Приготовление препаратов микроорганизмов	33
Лабораторная работа №4. Питательные среды	41
Лабораторная работа № 5. Посев на плотные и жидкие питательные среды... ..	53
Раздел 2. Микрофлора сырья растительного происхождения. Факторы, обуславливающие естественную защиту сырья, используемого в пищевой промышленности	69
Лабораторная работа № 6. Биохимические свойства микроорганизмов, выделенных в чистую культуру	74
Лабораторная работа № 7. Микробиологическое исследование муки на наличие картофельной палочки	83
Лабораторная работа № 8. Санитарно-микробиологический анализ кулинарных изделий.....	85
Лабораторная работа № 9. Микробиологический анализ консервов из растительного сырья... ..	93
Основные свойства бактерий, наиболее часто встречающихся в пищевых продуктах.....	97
Рекомендуемая литература	109

ВВЕДЕНИЕ

Мир микроорганизмов многочислен и разнообразен. Они повсеместно распространены в природе. Многие микроорганизмы наносят большой ущерб народному хозяйству, вызывая порчу продуктов сельскохозяйственного и промышленного производства. Без знания микрофлоры пищевых продуктов, специфических свойств микроорганизмов, их биохимической деятельности, зависимости развития от окружающей среды нельзя успешно выполнять задачи, поставленные перед наукой и практикой в области контроля качества, производства, хранения, реализации пищевых продуктов и максимального сокращения их потерь.

Пищевые продукты, употребляемые человеком, могут иметь животное и растительное происхождение. В связи с этим появляется возможность предсказать общие типы микроорганизмов, способные размножаться в них. При переработке и хранении растительного и животного сырья происходит увеличение или уменьшение количества микроорганизмов, первоначально присутствующих в нем. Любая жизнедеятельность микроорганизмов в пищевом сырье и продуктах его переработки приводит к изменению их химического и физического состава.

Задачами пищевой микробиологии являются: исследование микробиоты сырья, используемого в пищевой промышленности; микробиологический контроль технологического процесса; санитарно-микробиологический контроль готовой продукции; получение и использование высокоактивных производственных штаммов микроорганизмов; интенсификация технологических процессов, основанных на их жизнедеятельности; разработка новых методов предохранения пищевых продуктов от микробной порчи; использование новых способов и средств дезинфекции технологического оборудования.

Одной из форм изучения материала является лабораторная работа. Целью проведения лабораторных занятий является закрепление теоретических знаний студентов, полученных ими в ходе изучения дисциплины на лекциях и самостоятельно. Занятия лабораторного типа включают в себя следующие этапы:

изучение теоретической части лабораторной работы; конспектирование хода выполнения лабораторной работы и проведение ее экспериментальной части; выполнение необходимых рисунков; оформление отчета о проделанной работе; защита лабораторной работы. Для подготовки к занятиям лабораторного типа и защиты выполненных лабораторных работ студенты выполняют проработку методических указаний по выполнению лабораторной работы, уделяя особое внимание целям и задачам, теоретической части и порядку выполнения лабораторной работы; конспектирование источников; работу с конспектом лекций, просмотр рекомендуемой литературы.

Результаты каждой лабораторной работы оформляются в виде отчета. Отчет выполняется рукописным методом в тетради или на отдельных листах с титульным листом на нечетной странице, у которой обратная сторона остается чистой. Далее следуют разделы в следующей последовательности: цель работы, задание, ход выполнения работы, таблицы, рисунки и общий вывод по результатам ее выполнения. Переписывание теории с методических указаний не допускается.

Микробиологическая лаборатория и правила работы в ней.

1. Не входить в лабораторию в пальто, головном уборе, не вносить посторонние вещи.
2. Приступать к занятиям только надев хлопчатобумажный халат.
3. Не разрешается выходить в халате за пределы лаборатории и надевать на него верхнюю одежду.
4. В помещении лаборатории запрещается принимать пищу и хранить продукты питания.
5. Не выносить за пределы лаборатории посуду и материалы, которые используются для проведения лабораторных работ (пробирки, краски и т. д.).
6. Не класть на стол личные вещи (сумки, папки и др.), держать их на специально отведенных местах.
7. Если микроорганизмы попадают на оборудование, пол (разобьется пробирка или чашка Петри на которой они росли),

об этом сразу же надо сообщить преподавателю или лаборанту, а данное место обеззаразить, залив его дезинфицирующим раствором. После чего провести уборку.

8. Во время выполнения практических работ нельзя открывать форточки, надо соблюдать тишину, избегать лишнего движения и хождения, открывания и закрывания дверей – всего того, что усиливает движение воздуха.

9. Перед началом работы дежурные проводят влажную уборку помещения, а столы протираются дезинфицирующим раствором.

10. Каждый студент перед началом работы должен проверить все ли необходимое находится на его столе и исправен ли микроскоп.

11. Раздача всего необходимого для проведения лабораторной работы материала и посуды проводится лаборантом или дежурными.

12. На занятиях студенты должны иметь тетрадь и карандаши (простой и цветные – красный и синий). Рисунки при микроскопировании надо делать с препаратов, а не из книг или пособий.

13. Строго соблюдать правила обращения с химическими реактивами и красителями.

14. С большой осторожностью пользоваться смесью спирта с эфиром, не переносить ее на столы с горелками.

15. Поскольку некоторые микроорганизмы, особенно споры грибов, являются аллергенами, не допускать их распыления — не оставлять открытыми чашки Петри, пробирки, колбы с культурами микроорганизмов.

16. Перед тем как набирать ртом с помощью пипетки суспензии микроорганизмов или реактивы, убедиться в том, что пипетка закрыта с тупого конца ватой.

17. В лаборатории поддерживать порядок и чистоту. По окончании занятий протирать иммерсионный объектив микроскопа мягкой тканью, накрывать микроскоп полиэтиленовым чехлом, приводить в порядок рабочее место, мыть руки.

18. Помнить о том, что студенты несут ответственность за используемые ими микроскопы, другое лабораторное оборудование, чистоту рабочего места.

19. Сразу же после окончания работы все используемые

инструменты обеззараживают. Бактериальные петли и иглы прокаливают над пламенем спиртовки, а пипетки и стекла помещают в дезинфицирующий раствор.

20. Все используемые при работе микробные культуры сдают лаборанту, который проводит их обеззараживание или в автоклаве, или в дезинфицирующем растворе.

21. В конце занятий надо привести в порядок рабочий стол, протереть и убрать микроскоп, тщательно вымыть руки (при работе с заразным материалом их сначала дезинфицируют) и снять халат.

22. Перед уходом из лаборатории дежурному проверять, выключены ли вода и электроприборы.

Раздел 1. Основные группы микрофлоры, факторы внешней среды и механизм их действия на микроорганизмы

К микроорганизмам относятся преимущественно одноклеточные организмы – бактерии, микроскопические грибы и водоросли, простейшие, а также организмы с неклеточной организацией – вирусы. Предметом изучения микробиологии традиционно служат в основном бактерии, а также в общем плане организации рассматриваются вирусы. Микроорганизмы в таксономическом отношении очень неоднородная группа, представители которой отличаются друг от друга морфологией, строением, физиологией, типами конструктивного и энергетического метаболизма, а также особенностями питания клетки, но общим их признаком являются малые размеры особей.

Повсеместное распространение, быстрое размножение и особенности метаболизма микроорганизмов накладывают отпечаток на жизнь всей планеты. Процессы, в которых принимают участие микроорганизмы, прежде всего, являются определяющими и необходимыми звеньями круговорота таких элементов, как углерод, азот, сера, фосфор, а также других биогенных элементов. Без микроорганизмов приостановился бы круговорот веществ в природе и жизнь на Земле стала бы невозможной.

Без знания микрофлоры пищевых продуктов, специфических свойств микроорганизмов, их биохимической деятельно-

сти, зависимости развития от окружающей среды нельзя успешно выполнять задачи, поставленные перед наукой и практикой в области контроля качества, производства, хранения, реализации пищевых продуктов и максимального сокращения их потерь.

Лабораторная работа 1. Устройство микроскопа и его использование в микробиологической практике

1. Цель работы

1.1. Усвоить правила пользования микроскопом и научиться работать с ним.

2. Задание

2.1. Изучить устройство микроскопа и правила работы с ним.

2.2. Промикроскопировать готовые препараты с объективом 8х или 10х и 90х или 100х.

2.3. Сделать выводы и оформить отчет.

3. Теоретическая часть

Микроскоп представляет собой прибор (рис. 1), с помощью которого можно значительно увеличить изображение, детально изучить строение и структур рассматриваемого объекта, а также замерить его детали, плохо различимые или вообще невидимые невооруженным глазом. Сферы использования микроскопов:

- биология (медицинские исследования, врачебная практика);
- металлографические (промышленные лаборатории, изучение непрозрачных объектов);
- стереоскопические (увеличение объектов во время операций на производстве);
- поляризационные (научно-исследовательские лаборатории для исследований в поляризованном свете, недоступном для глаза человека).

3.1. Светлопольная микроскопия

Изучение невидимых невооруженным глазом клеток микроорганизмов, размеры которых не превышают десятков и сотен микрометров ($1 \text{ мкм} = 0,001 \text{ мм}$), возможно только при помощи микроскопов (от греч. *mikros* – малый, *skopeo* – смотрю). Эти приборы позволяют получать в сотни раз (световые микроскопы) и в сотни тысяч раз (электронные микроскопы) увеличенное изображение исследуемых объектов.

При помощи микроскопа изучают морфологию клеток микроорганизмов, их рост и развитие, проводят первичную идентификацию (от лат. *identificare* – отождествление) исследуемых микроорганизмов, ведут наблюдения за характером развития микробных ценозов (сообществ) в почве и других субстратах.

3.2. Устройство микроскопа

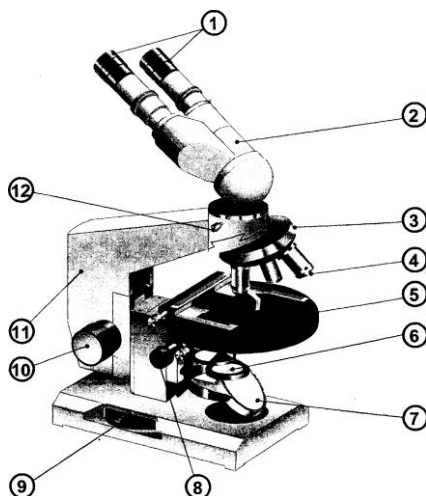


Рис. 1. Микроскоп с бинокулярной насадкой и зеркалом:
1 – окуляры; 2 – бинокулярная насадка; 3 – «револьвер»;
4 – объектив; 5 – предметный столик; 6 – конденсор; 7 – зеркало; 8 – рукоятка перемещения кронштейна конденсора; 9 – рукоятка тонкой фокусировки (микровинт); 10 – рукоятка грубой фокусировки (макрровинт); 11 – тубодержатель; 12 – винт для крепления бинокулярной насадки

Микроскоп состоит из двух частей: механической (подсобной) и оптической (главной).

Механическая часть микроскопа. К ней относят штатив, предметный столик и тубус (трубу).

Штатив имеет основание в виде подковы и колонку (тубусодержатель) в форме дуги. К нему примыкают коробка механизмов, система зубчатых колес для регуляции положения тубуса. Система приводится в движение вращением макрометрического и микрометрического винтов.

Макрометрический винт (кремальера, зубчатка, макровинт) служит для предварительной ориентировочной установки изображения рассматриваемого объекта.

Микрометрический винт (микровинт) используют для последующей четкой установки на фокус. При полном повороте микровинта труба передвигается на 0,1 мм (100 мкм).

При вращении винтов по часовой стрелке труба опускается по направлению к препарату, при вращении против часовой стрелки — поднимается от препарата.

Предметный столик служит для размещения на нем препарата с объектом исследования. Предметный столик вращается и перемещается во взаимно перпендикулярных плоскостях с помощью винтов. В центре столика находится круглое отверстие для освещения препарата снизу лучами света, направляемыми зеркалом микроскопа. В столик вмонтированы два зажима (*клеммы*) – пружинящие металлические пластинки, предназначенные для закрепления препарата.

Если необходимо исследовать поверхность препарата, не допуская пропусков (что важно при подсчете), или же если во время работы требуется повторное исследование какого-либо определенного участка на препарате, на предметный столик помещают *препаратопроводитель*. На нем имеется система линеек – нониусов, с помощью которых можно присвоить координаты любой точке исследуемого объекта. Для этого при установке препаратопроводителя следует совместить центр вращения столика и оптическую ось системы микроскопа с центрировочной пластинкой препаратопроводителя (отсюда предметный столик с препаратопроводителем называют иногда крестообразным).

Тубус (труба) – оправа, в которую заключены элементы оптической системы микроскопа. К нижней части тубуса прикрепляется револьвер (объективодержатель) с гнездами для объективов. Современные модели микроскопов имеют наклонный

тубус с дугообразным тубусодержателем, что обеспечивает горизонтальное положение предметного столика.

Оптическая часть микроскопа состоит из основного оптического узла (объектив и окуляр) и вспомогательной осветительной системы (зеркало и конденсор). Все части оптической системы строго центрированы относительно друг друга.

Во многих современных микроскопах зеркало и конденсор заменены вмонтированным в прибор регулируемым источником света.

Осветительная система находится под предметным столиком. *Зеркало* отражает падающий на него свет в конденсор. Одна сторона зеркала плоская, другая — вогнутая. При работе с конденсором необходимо пользоваться только плоским зеркалом. Вогнутое зеркало применяют при работе без конденсора с объективами малых увеличений. *Конденсор* (от лат. *condense* — уплотняю, сгущаю), состоящий из 2–3 короткофокусных линз, собирает лучи, идущие от зеркала, и направляет их на объект. Конденсор необходим, прежде всего, при работе с иммерсионной системой. Линзы конденсора вмонтированы в металлическую оправу, соединенную с зубчатым механизмом, позволяющим перемещать конденсор вверх и вниз специальным винтом. Для регулировки интенсивности освещения в конденсоре есть *ирисовая* (лепестковая) *диафрагма*, состоящая из стальных серповидных пластинок.

Окрашенные препараты лучше рассматривать при почти полностью открытой диафрагме, неокрашенные – при уменьшенном отверстии диафрагмы.

Под конденсором располагается *кольцевидный держатель* для светофильтров (обычно к микроскопу прилагаются синее и белое матовые стекла). При работе с искусственным источником света светофильтры создают впечатление дневного освещения, что делает микроскопирование менее утомительным для глаз.

Объектив (от лат. *objectum* – предмет) – наиболее важная часть микроскопа. Это многолинзовая короткофокусная система, от качества которой зависит в основном изображение объекта. Наружная линза, обращенная плоской стороной к препарату, называется фронтальной. Именно она обеспечивает увеличение. Остальные линзы в системе объектива выполняют преимущест-

венно функции коррекции оптических недостатков, возникающих при исследовании объектов.

Один из таких недостатков – явление *сферической аберрации*. Оно связано со свойством линз неравномерно преломлять периферические и центральные лучи. Первые обычно преломляются в большей степени, чем вторые, и поэтому пересекаются на более близком расстоянии к линзе. В результате изображение точки приобретает вид расплывчатого пятна.

Хроматическая аберрация возникает при прохождении через линзу пучка лучей с различной длиной волны. Преломляясь по-разному, лучи пересекаются не в одной точке. Синевioletовые лучи с короткой длиной волны преломляются сильнее, чем красные с большей длиной волны. Вследствие этого у бесцветного объекта появляется окраска.

К объективам, устраняющим сферическую и частично хроматическую аберрацию, относятся *ахроматы*. Они содержат до 6 линз и корригируют первичный спектр (желто-зеленую часть спектра), не устраняя вторичного спектра. Изображение, получаемое с помощью ахроматов, не окрашено, но края его имеют красный или синеватый ореол. В современных ахроматах этот недостаток практически неуловим.

Объективы бывают сухие и погружные (иммерсионные). При работе с *сухими* объективами между фронтальной линзой объектива и объектом исследования находится воздух. Оптический расчет *иммерсионных* объективов предусматривает их работу при погружении фронтальной линзы объектива в жидкую однородную среду.

При работе с иммерсионным объективом необходимо поместить между покровным стеклом и линзами объектива *кедровое масло*¹, показатель преломления которого близок к показателю преломления стекла (табл. 1).

¹ Кедровое масло получают из семян виргинского можжевельника *Juniperus virginiana* или зеравшанской арчи *Juniperus seravschana*. В настоящее время в качестве иммерсионной жидкости чаще применяют синтетические продукты, соответствующие по оптическим свойствам кедровому маслу.

Показатели преломления некоторых соединений

Вещество	Показатель
Воздух	1,00
Стекло	1,52
Вода	1,33
Глицерин	1,47
Касторовое масло	1,48–1,49
Льняное очищенное осветленное масло	1,491–1,486
Кедровое масло	1,515
Смесь касторового масла с гвоздичным (жидкость Мера)	1,515
Гвоздичное масло	1,53
Канадский бальзам	1,536
Анисовое масло	1,557
Монобромнафталин	1,658

Лучи в оптически однородной гомогенной среде не меняют своего направления. Иммерсионные объективы на оправе имеют черную круговую нарезку и обозначения: I – immersion (иммерсия), HI – homogen immersion (однородная иммерсия), OI – oil immersion, MI – масляная иммерсия.

Объективы различают по их увеличению.

Собственное увеличение объектива (V) определяют по формуле 1:

$$V = \frac{I}{f} \quad (1)$$

где I — оптическая длина тубуса или расстояние между фокальной плоскостью объектива и плоскостью изображения, составляющее для разных объективов 128–180 мм; f – фокусное расстояние объектива: чем оно больше, тем меньше увеличение объектива.

Величина увеличения объективов обозначена на их оправе (8х, 40х, 90х). Каждый объектив характеризуется, кроме того, определенной величиной рабочего расстояния в миллиметрах.

У объективов с малым увеличением расстояние от фронтальной линзы объектива до препарата больше, чем у объективов с большим увеличением. Так, объективы с увеличением 8х, 40х и 90х имеют соответственно рабочие расстояния 13,8; 0,6 и 0,12 мм. В зависимости от того, с каким объективом работают, для его фокусировки выбирается макрометрический и микрометрический винт. Иммерсионный объектив имеет рабочее расстояние до объектива 0,12 мм, поэтому его нередко называют «близоруким»

У объективов малых увеличений не только большие рабочие расстояния, но и большие поля зрения. В связи с этим рекомендуется исследование препарата начинать с помощью объектива с небольшим увеличением.

Объективы рассчитаны на работу с покровным стеклом толщиной $0,17 \pm 0,1$ мм. Если стекло не соответствует стандарту, необходимо регулировать объектив вращением кольца коррекционной оправы, которой оснащены современные высококачественные объективы. При отсутствии такой оправы сферическую аберрацию, вызываемую покровным стеклом, следует устранить, поднимая или опуская тубус микроскопа.

Одна из важных, характеристик объектива – *разрешающая способность*, обуславливающая в конечном итоге разрешающую способность микроскопа в целом. Она определяет наименьшее расстояние между двумя точками на препарате, при котором их изображение будет раздельным. Разрешающая способность объектива зависит от его числовой апертуры и длины волны света, при которой происходит исследование объекта. Математически такая зависимость выражается формулой 2:

$$d = \frac{\lambda}{2A}. \quad (2)$$

Где λ – длина волны света, воспринимаемая человеческим глазом (0,4–0,7 мкм, средняя длина волны – 0,55 мкм); А – числовая (нумерическая) апертура объектива.

При определении разрешающей способности объектива (микроскопа) следует различать два случая:

- освещение *прямое* (лучи падают параллельно оптической оси микроскопа);
- освещение *косое*. При косом освещении d в 2 раза меньше, чем при прямом.

Предел разрешающей способности объектива или наименьшую величину d можно представить следующим образом:

пусть значение λ – наименьшее (для более коротких, чем видимые, ультрафиолетовых лучей оно равно 350 нм), а значение A — максимальное (в наиболее совершенных иммерсионных системах – 1,4–1,6). В этом случае разрешающая способность объектива будет наибольшей, хотя по абсолютной величине она – наименьшая.

Для условий работы микроскопов величина λ постоянна, так как объекты исследуются при дневном освещении ($\lambda = 0,55$ мкм). Следовательно, предел разрешающей способности объектива в данном случае зависит исключительно от возможности повышения числовой (численной, или нумерической) апертуры A .

Числовая апертура объектива характеризует его светособирательную способность и определяется по формуле 3:

$$A = n \cdot \sin \frac{1}{2}\alpha, \quad (3)$$

где n – показатель преломления светового луча, проходящего через предметное стекло в среду между фронтальной линзой объектива и предметным стеклом; α – угол, одна сторона которого совпадает с оптической осью, а другая образована линией, соединяющей точку выхода эффективных лучей из объектива с границей действующего отверстия объектива;

Важно, чтобы значение величины n было максимальным. Повысить его можно введением в промежуток между фронтальной линзой объектива и предметным стеклом среды с n , близким к n стекла. На практике это достигается использованием иммерсионных объективов с введением кедрового масла ($n = 1$).

Дальнейшего повышения n можно достичь введением среды с показателем преломления более высоким, чем у стекла.

Окуляр (от лат. *ocularis* – глазной) служит непосредственным продолжением «линз» (хрусталиков) глаз человека. Преломляющую систему глаза можно рассматривать как двояковыпуклую линзу со средним фокусным расстоянием 15 см (расстояние наилучшего зрения 25 см).

Окуляр состоит из двух линз – *глазной* (верхней) и *полевой*, или *собирающей* (нижней), заключенных в металлическую оправу. Назначение полевой линзы – собирать лучи, идущие от объектива, таким образом, чтобы они проходили через маленькое отверстие глазной линзы.

Назначение окуляра – прямое мнимое увеличение действительного обратного и увеличенного изображения, которое дает объектив. Увеличение окуляра выгравировано на его оправе. Рабочее увеличение окуляров колеблется в пределах от 4х до 15х. Собственное увеличение окуляра вычисляют по формуле 4, применяемой для определения увеличения луп,

$$K = \frac{L}{F} \quad (4)$$

где L – расстояние наилучшего зрения, равное 25 см; F – фокусное расстояние линз окуляра.

При длительной работе с микроскопом следует пользоваться двойными окулярами – *бинокулярной насадкой*. Бинокулярные насадки часто имеют собственное увеличение (около 1,5 х) и снабжены коррекционными линзами. Корпуса насадки могут раздвигаться в пределах 55–75 мм в зависимости от расстояния между глазами наблюдателя. Работа с бинокулярной насадкой улучшает видимость объекта, снижает яркость изображения и тем самым сохраняет зрение.

3.2. Основные технические характеристики микроскопа

Качество микроскопа определяется его увеличительной и разрешающей способностями.

Увеличительная способность микроскопа.

Теоретически микроскоп может дать увеличение 2000х раз и более. Однако следует различать полезное и бесполезное увеличения микроскопа. Пределы полезного увеличения в обычно используемых микроскопах достигают 1400х. При превышении границ полезного увеличения возникает дифракция и другие явления, обусловленные волновой природой света. Они незаметны в пределах полезного увеличения, но приводят к оптическим ошибкам в зоне бесполезных увеличений.

Увеличение, которое дает возможность рассматривать объект под предельным углом зрения, и есть *полезное увеличение*. Оно обычно превышает числовую апертуру объектива в 500–1000 раз. Например, для объектива с увеличением 40х, имеющего числовую апертуру 0,65, полезное увеличение составляет 325–650х. Такое увеличение позволяет различить все структуры, разрешаемые данным объективом. Поэтому, чтобы получить общее увеличение в пределах полезного, для объектива 40х следует брать окуляр 15х.

Применение более сильных окуляров не поможет выявлению более тонких деталей объекта.

Если объектив имеет увеличение 90х (числовая апертура – $A = 1,25$), то полезное увеличение для него равно 1250х. Следовательно, и в данном случае, чтобы не выходить за пределы полезного увеличения, не следует применять окуляры с увеличением более 15х.

Разрешающая способность микроскопа. Эта характеристика особенно важна при исследовании микрообъектов и их структур. Если увеличительная способность микроскопа зависит от объектива и окуляра, то разрешающая способность определяется главным образом объективом и конденсором. Расчет разрешающей способности микроскопа проводят по формуле 5:

$$d = \frac{\lambda}{2A}. \quad (5)$$

Максимальная разрешающая способность светового микроскопа составляет 0,2 мкм.

Пример расчета разрешающей способности микроскопа. Если $V = 40x$, $A = 0,65$, то

$$d = \frac{0,55}{2 \times 0,65} = 0,42 \text{ (мкм)}$$

Если $V = 90\times$, $A = 1,25$, то

$$d = \frac{0,55}{2 \times 1,25} = 0,22 \text{ (мкм)}$$

Разрешающая способность микроскопа тем лучше, чем меньше абсолютная величина d .

Среди существующих моделей современных микроскопов наиболее распространены микроскопы биологические исследовательские (МБИ-1, МБИ-2, МБИ-3, МБИ-6, МБИ-10 и учебные микроскопы биологические рабочие (МБР-1, МБР-1А).

4. Работа с микроскопом

Основные правила работы с микроскопом. Место для микроскопа выбирают подальше от прямого солнечного света. Работа на столе с темной поверхностью меньше утомляет глаза.

Лучше смотреть в окуляр левым глазом, не закрывая правого. В случае работы с бинокулярной насадкой сначала регулируют расстояние между окулярами в соответствии с расстоянием между глазами наблюдателя так, чтобы поля зрения обоих окуляров слились в одно.

Переносить микроскоп необходимо двумя руками: одной держать штатив, другой – основание микроскопа. Следует предохранять микроскоп от толчков, соприкосновения с сильнодействующими веществами (кислотами, щелочами и т. п.).

Не рекомендуется вынимать окуляр из трубы, чтобы не загрязнять пылью трубу и объективы.

Линзы должны быть всегда чистыми. Нельзя касаться пальцами оптических поверхностей.

Микроскоп следует хранить в чехле.

Работа с иммерсионной системой микроскопа. При работе с иммерсионным объективом ($V = 90\times$; $A = 1,25$) необходимо установить зеркало плоской стороной вверх и поднять конденсор.

Каплю иммерсионной жидкости (кедрового масла) наносят на препарат, не размазывая ее по стеклу. Погружать в им-

мерсионную жидкость можно только иммерсионные объективы (не сухие!).

Глядя сбоку на предметное стекло, опускают объектив до поверхности масляной капли. Далее, глядя в окуляр, осторожно опускают объектив при помощи макровинта, следя за появлением изображения.

Когда изображение объекта появится, переходят к использованию микровинта. Если изображение нерезкое, тусклое или плывет – что-то сделано неправильно: загрязнена фронтальная линза объектива, мешают пузырьки воздуха в масле, случайно закрыта диафрагма, сдвинуты лампа или зеркало. Причину некачественного изображения надо устранить.

По окончании работы поднимают тубус, снимают препарат и осторожно протирают фронтальную линзу объектива хлопчатобумажной салфеткой, смоченной очищенным бензином.

Иммерсионную жидкость (кедровое масло) рекомендуют хранить в специальных двухкамерных масленках. В наружную камеру наливают ксилол или очищенный бензин для очистки объективов от масла, во внутреннюю – кедровое масло. Камеру с маслом герметично закрывают пробкой, в которую вставляют стеклянную палочку для нанесения капли масла на препарат.

Установка освещения. Удобнее пользоваться искусственным источником света – он более постоянен, чем дневной, лучше освещает объект, что особенно важно при работе с объективами с сильным увеличением (90х).

Освещение препарата по Кёлеру. Наилучшее освещение объекта достигается при использовании точечного источника света — осветителя (например, осветителей типа ОИ-7, ОИ-9, ОИ-19).

Принцип Кёлера состоит в том, что освещение апертуры коллектора осветителя, конденсора и объектива должно быть одинаковым.

Последовательность установки света по Кёлеру следующая:

- 1) на расстоянии 25–30 см от микроскопа с помощью соединительной планки (крестовины) устанавливают осветитель с низковольтной лампочкой;
- 2) препарат помещают на предметный столик, устанавливают объектив 8х, поднимают до упора конденсор, открыва-

ют полностью его ирисовую диафрагму, почти полностью закрывают полевую диафрагму осветителя, оставляя лишь небольшое отверстие (1,0–1,2 см в диаметре), отодвигают матовое стекло и ставят плоское зеркало;

3) включают осветитель, устанавливают яркость света таким образом, чтобы нить лампы не давала слишком большого накала (это вредно для глаз). На зеркало помещают белый лист бумаги и фокусируют на него изображение нити лампы осветителя;

4) глядя в окуляр, движением зеркала проектируют световой поток в поле зрения микроскопа, фокусируют препарат, опуская конденсор и улавливая изображение полевой диафрагмы осветителя в виде светлого круглого пятна. С помощью зеркала надо добиться того, чтобы световое пятно попало в центр поля зрения. Чем больше отверстие диафрагмы осветителя, тем больше световое пятно. Если оно занимает большую часть поля зрения, его следует уменьшить, сузив отверстие диафрагмы (делать это надо смотря в окуляр);

5) наблюдая в микроскоп, фокусируют препарат в области светового пятна, продолжая слегка опускать конденсор. Если все сделано правильно, то световое пятно, видимое одновременно с препаратом, должно быть равномерно освещено. В противном случае следует слегка повернуть корпус осветителя;

6) продолжая смотреть в окуляр, открывают диафрагму осветителя до тех пор, пока световое пятно не займет все поле зрения. Лучше, если освещенный круг немного выйдет за пределы поля зрения.

Положение зеркала, конденсора и диафрагмы осветителя больше не меняют. Диафрагмой конденсора пользуются только при смене объективов.

Установку света по Келлеру рекомендуют также и при темнопольной и фазово-контрастной микроскопии.

Измерение объектов. Измерять клетки микроорганизмов (в мкм) можно на фиксированных и живых препаратах с помощью шкалы окулярного микрометра – окулярной линейки. У кокков определяют диаметр клеток, у бактерий другой формы – длину и ширину.

Окулярная линейка – круглая стеклянная пластинка, в середине которой нанесена шкала делений (50 или 100 делений) общей длиной 5 мм. Вставляют окулярную линейку шкалой вверх на диафрагму окуляра, предварительно вывинтив линзу окуляра. Затем ставят препарат и определяют, скольким делениям линейки соответствует длина и ширина клетки. Измеряют не менее 10–20 клеток.

Чтобы рассчитать истинные размеры клеток, определяют цену деления окулярной линейки с помощью *объектного микрометра*. Он представляет собой металлическую пластинку в форме предметного стекла с отверстием в центре; в отверстие помещено стекло с линейкой (шкала из 100 делений). Общая длина шкалы объектного микрометра – 1 мм, величина одного деления – 10 мкм (0,01 мм).

Для определения цены деления окулярной линейки объектный микрометр помещают вместо препарата на столик микроскопа и фокусируют изображение линейки при малом увеличении. Затем линейку перемещают в центр поля и меняют объектив на тот, при котором измеряли клетки. Передвигая столик микроскопа, и поворачивая окуляр, устанавливают объектный и окулярный микрометры так, чтобы их шкалы были параллельны и одна перекрывала другую. Определение цены деления окулярного микрометра проводят по принципу *нониуса*, т. е. совмещают одну из черт шкалы окулярного микрометра с чертой объектного микрометра и находят следующее совмещение. Допустим, в двух делениях объектного микрометра (20 мкм) умещается пять делений окулярного микрометра, тогда одно деление окулярного микрометра при данном увеличении равняется 4 мкм (20:5). Зная, скольким делениям окулярной линейки соответствует длина и ширина изучаемых клеток, умножают цену деления окулярного микрометра на эти числа.

Полученные значения цены делений окулярной линейки справедливы только для данной системы *окуляр – объектив*.

4.1. Микроскопия в темном поле

В основе метода лежит *эффект Тиндаля* – рассеивающийся пучок света при наблюдении сбоку имеет вид голубоватого конуса на темном фоне. Другими словами, при освещении объек-

та косыми лучами света эти лучи, не попадая в объектив, остаются невидимыми для глаза, поэтому поле зрения выглядит темным. В то же время оптически неоднородные клетки, находящиеся в поле зрения и попадающие в сферу прохождения лучей, отклоняют их в такой степени, что лучи попадают в объектив. Поскольку лучи света идут именно от объектов, наблюдатель видит их в темном поле интенсивно светящимися.

Темное поле зрения можно создать в светооптическом микроскопе, заменив обычный конденсор темнопольным и применив источник сильного света. Однако, эффект «темного поля» может быть достигнут только в случае, если апертура конденсора превышает на 0,2–0,4 единицы апертуру объектива. Для исследования в темном поле рекомендуют конденсор с апертурой около 1,2 и объективы с апертурой 0,65–0,85. Важно обращать внимание на толщину предметных (0,8–1,2 мм) и покровных (0,17 мм) стекол, толщину препарата (в воде) и чистоту используемых стекол. Чем толще препарат и чем больше в нем посторонних частиц, преломляющих световые лучи, тем менее контрастно получаемое изображение, так как каждая частица, отражая лучи, освещает поле зрения.

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

5. Вопросы для самоконтроля

1. Что входит в состав механической части микроскопа?
2. Что входит в состав оптической части микроскопа?
3. Что входит в состав осветительной части микроскопа?

4. Какие объективы называются сухими?
5. Какие объективы называются иммерсионными?
6. Для чего при микроскопировании на больших увеличениях фронтальную линзу объектива помещают в каплю иммерсионного масла?
7. Правила работы с конденсором?
8. Правила работы с макро- и микровинтом?
9. Как определить увеличение монокулярного и бинокулярного микроскопа?

Лабораторная работа № 2. Дезинфекция и стерилизация

1. Цель работы

1.1. Ознакомиться с методами средствами и правилами дезинфекции и стерилизации.

2. Задание

2.1. Ознакомиться с основными методами дезинфекции и дезинфицирующими веществами.

2.2. Ознакомиться с основными методами стерилизации.

2.3. Подготовить к стерилизации лабораторную посуду: чашки Петри, пробирки и пипетки.

2.4. Провести стерилизацию лабораторной посуды.

3. Теоретическая часть

В естественных условиях микроорганизмы подвергаются воздействию разных по своей природе факторов внешней среды. Они могут либо стимулировать их развитие (стимулирующее действие), либо замедлять и прекращать их развитие, тормозя метаболические процессы (бактериостатическое действие), либо вызывать гибель микроорганизмов (бактерицидное действие).

В зависимости от своей природы все факторы, действующие на микроорганизмы, делятся на физические, химические и биологические. Наиболее сильное воздействие оказывают физические и химические факторы, такие как температура, влажность, осмотическое давление, ультрафиолетовые лучи, ионизирующая радиация, ультразвук, и различные химические вещества, а так-

же рН среды. Многие из них используются для подавления жизнедеятельности микроорганизмов. Наиболее чувствительны к их воздействию вегетативные клетки, а наиболее устойчивы споры.

Многие химические вещества даже в очень небольших концентрациях оказывают на микроорганизмы бактерицидное действие. Такие вещества называются антимикробными веществами. Антимикробным действием обладают соли тяжелых металлов (в частности, соли ртути, серебра, свинца), сильные окислители (озон, йод, хлорная известь, перекись водорода и др.), органические вещества (фенол, крезол, этиловый спирт, формальдегид и др.). Некоторые из них используются для подавления роста микроорганизмов. Они называются дезинфицирующими веществами, а уничтожение патогенных микроорганизмов с их использованием – дезинфекцией.

Дезинфекция широко применяется не только в лабораториях микробиологии, но и на различных пищевых предприятиях для обработки помещений, оборудования, посуды и рук работающих. В качестве дезинфицирующих веществ наибольшее практическое применение находят различные производные хлора (табл. 1) а также фенол и его производные (1–5%-ные растворы), йод (2%-ный раствор), этиловый и изопропиловый спирт (70%-ные растворы).

Приготовление и использование основных дезинфицирующих веществ. Бактерицидное действие веществ, содержащих хлор, основано на том, что, будучи сильным окислителем, он изменяет окислительно-восстановительный потенциал и инактивирует ферменты, блокируя их действие. Бактерицидное действие фенола проявляется вследствие того, что он активно поступает в бактериальную клетку, и вызывает денатурацию белков цитоплазмы и ферментов, нарушая обмен веществ и вызывая гибель микроорганизмов.

Выбор дезинфицирующего вещества, его концентрация, продолжительность срока дезинфекции зависят от конкретных условий: от того, какой объект подвергается дезинфекции, степени предполагаемого микробиального загрязнения и от устойчивости обеззараживаемых микроорганизмов.

Стерилизация, или обеспложивание (от лат. *sterilis* – бес-

плодный) – это полное уничтожение всех микроорганизмов (вегетативных и споровых, патогенных и непатогенных) в обрабатываемом объекте. При проведении микробиологических исследований для получения правильных результатов необходимо обеспечить стерильность работы, то есть не допустить попадания и развития посторонних микроорганизмов.

Это достигается в результате проведения работ при строго определенных условиях (определенных требований к помещению, оборудованию, посуде, питательным средам и т.д.). Посуда, инструменты, питательные среды, используемые для работы, должны быть стерильными, поэтому при проведении микробиологических исследований стерилизация является одной из важнейших операций.

Стерилизацию можно проводить различными способами: прокаливанием, паром под давлением, текучим паром, сухим жаром, кипячением, фильтрацией и др. Выбор способа стерилизации зависит от свойств стерилизуемого объекта, т. к. стерилизация не должна приводить к изменению его физического или химического состояния. Так, например, питательные среды никогда не будут стерилизовать сухим жаром, т. к. в их состав входит вода, которая при этом испарится.

Фламбирование – прокалывание в пламени спиртовки является самым быстрым и надежным способом стерилизации. В основном оно используется для обработки бактериальных петель, игл, пинцетов, предметных стекол. Стерилизуемый объект несколько раз проводят через пламя спиртовки. При прокалывании микроорганизмы и их споры сгорают. Этот вид стерилизации имеет довольно ограниченное применение, т. к. большинство предметов при прокалывании портятся.

3.1. Стерилизация сухим жаром.

Ее применяют для обработки лабораторной посуды и сухих материалов, например крахмала, мела. При этом стерилизуемый объект выдерживают при 170 °С в течение 2 ч (считая с того момента, как установлена необходимая температура) в печи Пастера (рис. 2) или в электросушильных шкафах. Поднимать температуру выше 170 °С не рекомендуется: ватные пробки и бумага начинают разрушаться (буреют, становятся ломкими).

Перед стерилизацией готовят посуду: колбы и пробирки закрывают ватными пробками, чашки Петри, пипетки заворачивают в бумагу и т. д. Подготовленную посуду кладут на полки шкафа так, чтобы она не прикасалась к стенкам, закрывают его дверцу и включают нагрев.

Продолжительность стерилизации зависит от температуры: при 150°C 2–2,5 часа, при 170°C 1–1,5 часа, при 180°C 45–50 мин и при 200°C 15–20 мин. Проводить стерилизацию при температуре выше 170°C не рекомендуется, т. к. при 180°C и выше бумага и вата обугливаются.

Время стерилизации начинают отсчитывать с того момента, когда температура достигнет нужной величины. После окончания стерилизации дверцы шкафа открывают только после того, как температура понизится, т. к. горячая посуда может потрескаться при соприкосновении с холодным воздухом. Стерилизовать среды этим способом нельзя, т. к. вода из них испарится.

3.2. Стерилизация текучим паром.

Текучим паром (100°C) обрабатывают предметы, портящиеся от сухого жара, и некоторые питательные среды, не выдерживающие более высокой температуры (среды с углеводами, МПЖ, молоко).

Проводят стерилизацию в кипятильнике Коха (рис. 2) по 30 мин в течение 3 суток ежедневно. Такая стерилизация называется *дробной*.

Кипятильник Коха – высокий металлический цилиндр с двойным дном, свободно закрывающийся конусообразной крышкой с отверстием для термометра. Снаружи цилиндр покрыт асбестом или линолеумом. На дно кипятильника наливают воду, устанавливают подставку с отверстиями для прохождения пара, на которую помещают стерилизуемые предметы. Продолжительность стерилизации отсчитывают с момента интенсивного выхода пара из-под крышки и повышения температуры до 100°C.

При однократном прогреве при температуре 100°C в течение 30 мин погибают вегетативные клетки, споры же многих микроорганизмов остаются жизнеспособными. После такого прогрева среду помещают на 24 ч в термостат при 28–30°C.

Споры, сохранившиеся при первом нагревании, успевают за это время прорасти в вегетативные формы, которые погибают при последующем нагревании. Затем эту операцию повторяют еще 2 раза. Так стерилизуют питательные среды, содержащие молоко, желатин и некоторые другие вещества.

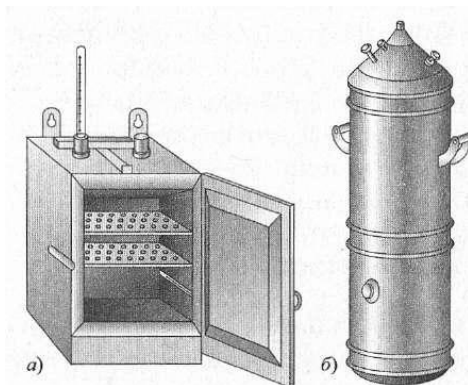


Рис. 2. Оборудование для стерилизации: а – печь Пастера;
б – кипятильник Коха

Если материал, в котором надо уничтожить микроорганизмы не выдерживает температуры в 100°C , проводят *тиндализацию*. Тиндализация – это метод дробной стерилизации, которую проводят на водяной бане снабженной терморегулятором или специальном аппарате, при температуре $60\text{--}65^{\circ}\text{C}$ 5–6 дней подряд по 1 часу ежедневно.

3.3. Стерилизация насыщенным паром под давлением

Это наиболее быстрый и надежный способ стерилизации, при котором гибнут самые устойчивые споры. С его помощью стерилизуют большинство питательных сред, посуду.

Обработку насыщенным паром проводят в герметически закрывающемся толстостенном котле – *автоклаве* (рис. 3).

Этот способ стерилизации основан на том, что образующийся при кипячении пар скапливается в замкнутом пространстве. В результате чего повышается давление. Увеличение дав-

ления, в свою очередь, приводит к повышению температуры пара.

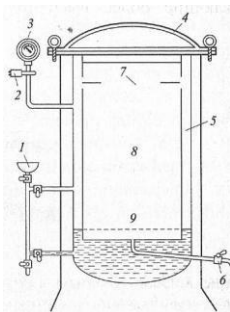


Рис. 3. Схема автоклава: 1 – воронка, через которую автоклав заправляют водой; 2 – предохранительный клапан; 3 – манометр; 4 – крышка автоклава; 5 – водопаровая камера; 6 – кран для выпуска воздуха; 7 – отверстие, через которое пар поступает в стерилизационную камеру; 8 – стерилизационная камера; 9 –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

Совместное действие высокой температуры и повышенного давления оказывает синергический эффект – они совместно усиливают друг друга, что обеспечивает быстрое уничтожение, как вегетативных форм микроорганизмов, так и их спор. Стерилизация паром под давлением используется для стерилизации питательных сред и посуды.

Автоклав состоит из кожуха, крышки и двух котлов, которые вставлены один в другой. Крышка автоклава герметически привинчивается к кожуху. Наружный котел называют водопарной камерой, в нем происходит образование пара. Внутренний котел называют стерилизационной камерой – в него помещают материал, который нужно стерилизовать. В его верхней части есть отверстия, через которые поступает пар из водопарной камеры.

Автоклав снабжен манометром, предохранительным клапаном, водомерным стеклом, воздушным, конденсационным и выпускным кранами. Манометр служит для определения давления в стерилизационной камере. В неработающем автоклаве стрелка стоит на нуле, т. к. нормальное атмосферное давление принимается за нуль. Между температурой и показаниями манометра

существует строгая зависимость (табл. 2).

Предохранительный клапан предохраняет от чрезмерного повышения давления. Если давление превысит установленную величину, клапан автоматически открывается и выпускает лишний пар.

Таблица 2

*Соотношение между показаниями манометра
и температурой кипения воды*

Показания манометра, атм	0	0,2	0,4	0,5	0,6	0,8	1,0	1,5
Температура кипения воды, °С	100	105	110	112	114	117	121	127

Водомерное стекло показывает уровень воды в водопарном котле. На нем нанесены две горизонтальные черты, ограничивающие допустимые верхний и нижний уровни воды в котле. Воздушный кран служит для удаления воздуха из камер в начале стерилизации.

Конденсационный кран служит для удаления конденсата, который образуется в период повышения температуры при нагревании материала, который подвергается стерилизации. После окончания стерилизации крышку открывают только после того, как стрелка манометра установится на нуле.

Время стерилизации начинают отсчитывать с того момента, когда стрелка манометра установится на заданном давлении. Температура и продолжительность стерилизации зависят от материала, который стерилизуется, его количества и качественного состава микрофлоры на нем. При давлении пара в 2 атм (по показанию манометра 1 атм) и температуре 120°С споровые и вегетативные клетки микроорганизмов погибают в течение 20–30 мин.

Среды содержащие сахара, витамины и некоторые белковые вещества автоклавируют при дополнительном давлении 0,5 атм и температуре 112°С в течение 20–30 мин, мясопептонные среды в течение того же времени при дополнительном давлении 1,0 атм и температуре 120°С.

Стерилизацию ведут следующим образом. Наливают воду в автоклав, помещают в него стерилизуемые предметы, завин-

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

Для контроля над работой автоклавов среди стерилизуемых предметов можно закладывать специальные тесты-ампулы, содержащие химические вещества, которые плавятся при определенной температуре. Так, температура плавления бензонафта 110°C, антипирина 113°C.

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

3.4. Стерилизация кипячением

Стерилизацию кипячением проводят в стерилизаторах, в которые наливают дистиллированную воду. Продолжительность кипячения 20–30 мин. Кипячением стерилизуют металлическую посуду. Для предотвращения от ржавления и потери остроты ножницы, скальпели и пинцеты кипятят в 2% растворе гидрокарбоната натрия. Если же их кипятят в воде, режущие части предварительно оборачивают ватой, чтобы они не затупились.

3.5. Стерилизация с использованием бактериальных фильтров (механическая стерилизация)

Фильтры изготовляют из различных мелкопористых веществ. Существуют фарфоровые или керамические (свечи Шамберлана), асбестовые (фильтры Зейтца), коллоидные и стеклянные фильтры. Различные марки этих фильтров различаются размерами пор. Чем больше номер фильтра, тем меньше

размер пор.

Бактериальные фильтры, которые из-за их формы иногда называют свечами, перед употреблением обязательно стерилизуют в автоклаве. Фильтрованием стерилизуют жидкости, которые портятся при нагревании. Это главным образом различные лекарственные препараты.

3.6. Стерилизация ультрафиолетовыми лучами

Она применяется для уничтожения микроорганизмов в воздухе помещений. Она имеет ограниченное применение из-за низкой проникающей способности ультрафиолетовых лучей.

3.7. Пастеризация

Пастеризация представляет собой неполную, или частичную, стерилизацию, что означает нагревание при 65–80°C в течение соответственно 30–10 мин с последующим быстрым охлаждением до 10–11°C. Прием был предложен *Л. Пастером* для уничтожения неспорообразующих бактерий в продуктах, чьи свойства ухудшаются при кипячении (молоко, пиво, вино и др.).

Холодная стерилизация – фильтрование через мелкопористые фильтры. Ее применяют для обработки сред, компоненты которых легко разлагаются при нагревании. Через мелкие поры фильтра могут пройти только ультрамикрорганизмы (вирусы, бактериофаги).

Наиболее часто используют фильтры из *каолина* (полые цилиндры, закрытые с одной стороны). Чтобы жидкость прошла через такой фильтр, необходимо создать разницу давлений по обе стороны цилиндра. Этого достигают нагнетанием или откачиванием воздуха при помощи масляных насосов. Фильтр соединяют с приемником для жидкой среды, которым служит колба Бунзена. Оттянутый конец колбы закрывают ватной пробкой. Смонтированный фильтр с приемником стерилизуют.

Среду для стерилизации наливают в сосуд, в который помещают фильтр, а колбу Бунзена с ватной пробкой соединяют с насосом (масляным или водоструйным) и выкачивают воздух. Поскольку внутри фильтра давление стало ниже, чем над его поверхностью, жидкость под давлением проходит через фильтр в приемник. Бактерии остаются с внешней стороны фильтра.

Неудобства этого метода заключаются в медленной фильтрации и необходимости частой очистки фильтров.

4. Практическая часть

Посуда для микробиологических работ должна быть стерильной. Перед стерилизацией лабораторную посуду моют и сушат. Новую посуду кипятят в 1% растворе соды или мыльной воды, затем промывают и, для нейтрализации избытка щелочи, погружают на несколько часов в 1–2% раствор соляной кислоты. После чего промывают сначала холодной водопроводной водой, а затем дистиллированной и, не вытирая, высушивают.

Посуду, бывшую в употреблении, дезинфицируют. Используемые пробирки и чашки Петри стерилизуют в автоклаве, после чего обеззараженную жидкость можно слить в канализацию. Посуду, если она не очень грязная моют горячей водой с содой и мылом.

Очень грязную посуду заливают на 30–40 мин хромовой смесью, а затем промывают в большом количестве проточной воды. Или ее выдерживают в 20% растворе серной кислоты в течение суток, затем моют в горячей воде, тщательно прополаскивают и высушивают. Высушенную посуду просматривают на свет. Стекло должно быть прозрачным, на нем не должно быть матового налета и пятен.

Посуду, которая будет использоваться для приготовления питательных сред и культивирования микроорганизмов, нельзя обрабатывать дезинфицирующими веществами, т. к. их остатки могут вызвать изменения в питательной среде и сделать ее непригодной для развития микроорганизмов.

Колбы, пробирки и флаконы перед стерилизацией закрывают ватно-марлевыми пробками. Чашки Петри и пробирки стерилизуют, завернув их в бумагу. Пробирки по 1–5 штук, а пробирки по 10–15 штук. В бумагу заворачивают и пипетки и трубочки. Перед этим в верхнюю часть пипеток и трубочек вставляют кусочки ваты, которые будут предотвращать попадание микроорганизмов в грушу при заборе материала.

4.1. Подготовка посуды к стерилизации

4.1.1. Приготовить к стерилизации пробирки и колбы

Для этого 3–5 чистых пробирок и 1–2 колбы закрывают ватными пробками. Пробки готовят из гигроскопической ваты, поскольку она хорошо обеспечивает стерильность субстрата и не сильно тлеет. Для изготовления пробки берут прямоугольный кусочек ваты, загибают его края и сворачивают плотным валиком, примеривая его к горлышку пробирки или колбы.

Валик плотно обворачивают марлей так, чтобы вся вата была под ней, и завязывают нитками. Лишние концы марли обрезают. Пробка для пробирок должна иметь длину не более 3 см, быть достаточно плотной, хорошо сохранять свою форму и свободно входить в пробирку. Поверх пробки на колбу надевают бумажные колпачки, которые предохраняют ее горлышко от пыли.

4.1.2. Подготовить к стерилизации пипетки

В верхнюю часть 3–5 пипеток и трубочек при помощи препаровальной иглы вставляют кусочек ваты. Если вата выступает из пипетки, ее обрезают или обжигают в пламени спиртовки. Плотную бумагу нарезают полосками шириной 5–6 см и длиной 60–70 см. Полоску бумаги кладут на стол, и загибают ее левый конец под углом 45°С. На двойной слой бумаги кладут острый конец пипетки, загибают на него бумагу и плотно заворачивают. Затем, вращая пипетку, наматывают на нее по спирали бумагу, пока она вся не будет плотно завернута. Для того чтобы бумага не развернулась, конец полоски закручивают.

4.2. Подготовка к стерилизации ваты и марли

Перед стерилизацией марлю нарезают кусочками, а вату сворачивают в виде шариков. После чего заворачивают их по 1–3 штуки в плотную бумагу так, чтобы она не разворачивалась, например, в виде кулечка.

4.3. Провести стерилизацию посуды

Подготовленную к стерилизации посуду и вату загружают в сушильный шкаф не слишком плотно для того, чтобы воздух мог

циркулировать по всей камере и обеспечивался равномерный нагрев. Закрывают дверцу и включают нужную температуру.

4.4. Провести стерилизацию бактериальных петель

Бактериальные петли стерилизуют в пламени спиртовки. Их делают из нихромовой или платиновой проволоки для того, чтобы при прокаливании не появлялась окалина. Если петля сухая ее в вертикальном положении вносят в верхнюю, самую горячую часть пламени, и прокаливают до красного каления сначала нижнюю, а затем верхнюю часть. Если на петле находится какой-нибудь материал, ее в горизонтальном положении вносят в нижнюю, холодную часть пламени и только после того, как материал полностью сгорит, продолжают прокалывание в верхней, горячей части пламени.

5. Вопросы для самопроверки

1. Какой процесс называется дезинфекцией?
2. Какие вещества используются для проведения дезинфекции?
3. Какой процесс называется стерилизацией?
4. Что такое промышленная стерилизация?
5. Какими способами можно проводить стерилизацию?
6. Что и при каких условиях стерилизуют в автоклаве?
7. Что и при каких условиях стерилизуют в сушильном шкафу?
8. Что и при каких условиях стерилизуют кипячением?

Лабораторная работа № 3. Приготовление препаратов микроорганизмов

1 Цель работы

1.1 Научиться готовить препараты микроорганизмов и проводить их окраску.

2 Задание

2.1. Ознакомиться с приготовлением препаратов бактерий в «раздавленной» и «висячей» капле.

2.2. Приготовить три фиксированных препарата и окрасить их:

- один простым способом;
- один сложным способом (по Граму);
- один способом, при котором окрашиваются споры.

2.3. Микроскопировать окрашенные препараты.

2.4. Оформить отчет, зарисовать увиденное под микроскопом в тетрадь и сделать выводы.

3 Теоретическая часть

Микроскопирование микроорганизмов можно проводить как в живом состоянии, так и в убитых культурах, как в окрашенном, так и в неокрашенном виде. Микроорганизмы содержат большое количество воды, поэтому свет через них хорошо проходит и для того, чтобы увидеть их под микроскопом, необходимо правильно приготовить препараты.

Для работы с микроорганизмами используют специальные бактериологические *иглы*, *петли* и *шпатели* (рис. 4). Их изготавливают из проволоки, которую закрепляют в специальных металлических держателях или впаивают в стеклянные палочки. Толщина игл и петель не должна превышать 0,5 мм, толщина шпателя может быть 1,5 мм и более.

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

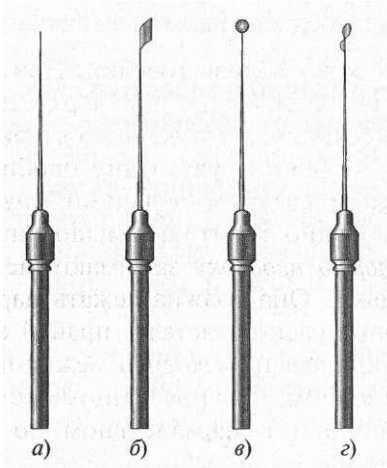


Рис.4. Инструменты, используемые при работе с микроорганизмами:

а — бактериологическая игла; б — шпатель; в, г — петли: в — петля, сделанная правильно, г — петля, сделанная неправильно.

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

4. Порядок выполнения работы

Исследование живых клеток микроорганизмов методами раздавленной и висячей капли. В обоих случаях окрашивание объекта проводят «прижизненными» красителями — *витальная окраска*. Прижизненными красителями могут служить метиленовый синий, нейтральный красный в концентрациях от 0,001 до 0,0001%.

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

Препараты микроскопируют, слегка затемняя поле зрения; конденсор немного опускают, поступление света регулируют вогнутым зеркалом. Вначале пользуются малым увеличением — объектив 8х, после того как обнаруживают край капли, устанавливают объектив 40х или иммерсионный (90х). Более четкие

результаты можно получить при микроскопии в темном поле или в фазовом контрасте.

В случае использования *метода раздавленной капли* на середину чистого предметного стекла наносят каплю воды, в неё вводят немного бактерий, взятых с плотной питательной среды кончиком стерильной бактериологической иглы. Тщательно перемешивают петлей полученную суспензию (она должна быть слабо мутной) и равномерно распределяют (размазывают) ее тонким слоем. Накрывают каплю покровным стеклом так, чтобы под ним не образовывались пузырьки воздуха. Стеклопалочкой прижимают покровное стекло к предметному и удаляют избыток воды фильтровальной бумагой, поднося ее к краям покровного стекла. При просмотре приготовленного препарата под микроскопом с иммерсионным объективом на покровное стекло наносят каплю кедрового масла.

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

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

4.1 Приготовление препаратов микроорганизмов

Пробирку с культурой держат в левой руке почти в горизонтальном положении вблизи горелки. Перед взятием культуры правой рукой вынимают ватную пробку из пробирки, зажимая ее между мизинцем и ладонью, а края пробирки обжигают на пламени горелки. Иглу держат в правой руке большим, указа-

тельным и средним пальцами. Обожженной в пламени бактериологической иглой из пробирки берут небольшое количество микробной массы.

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

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

4.2 Приготовление мазка

На чистое обезжиренное предметное стекло наносят каплю водопроводной воды. Для обезжиривания стекол используют смесь этилового спирта и серного эфира в соотношении 1:1. Эти операции проводят вдали от горелок. Прокаленной бактериологической иглой из пробирки с культурой берут небольшое количество микробной массы и вносят в каплю воды. Каплю тщательно размазывают петлей по стеклу на площади около 4 см².

В случае если суспензия густая, ее сначала разводят водой. Для этого прокаленной петлей берут немного суспензии и переносят каплю воды на другое предметное стекло. Суспензию нормальной густоты размазывают тонким слоем по стеклу, затем мазок сушат на воздухе при комнатной температуре или (для ускорения) в токе теплого воздуха над пламенем спиртовки, не допуская перегрева стекла. Стекло при этом надо держать мазком вверх. Сильное нагревание препарата при сушке не рекомендуется для избегания коагуляции белков, искажающей структуру и форму клеток. После чего проводят *фиксацию мазка*. Для этого стекло с сухим мазком проводят 3–4 раза над пла-

менем спиртовки, прикасаясь к нему той стороной, где мазок отсутствует или другой фиксатор (хромовые соединения, формалин, осмиевую кислоту, ацетон).

Один из распространенных приемов фиксации — обработка препарата 96%-ным спиртом или смесью равных объемов этилового спирта и эфира (жидкость* Никифорова). Для этого препараты погружают на 10–30 мин в фиксирующую жидкость.

4.3 Окрашивание препарата

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

Существуют простые и дифференцированные методы окраски.

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

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

Окраска мазка простым способом.

На охлажденный фиксированный мазок на 20–40 сек наносят 2–3 капли карболового фуксина Циля, после чего краску смывают. Промывание заканчивают, когда вода станет бесцветной. Промытый препарат просушивают на воздухе. Для более быстрого высыхания нижнюю часть и края стекла, на которых нет препарата, можно промокнуть фильтровальной бумагой.

Окраска спор бактерий.

Для окраски спор готовят мазок бактерий. На сухой мазок

наносят 1–2 капли 0,5%-ого раствора соляной кислоты и нагревают его 1–2 минуты над пламенем спиртовки (до выделения паров).

Остатки кислоты сливают, мазок промывают водой, высушивают на воздухе и фиксируют в пламени спиртовки.

На охлажденный фиксированный мазок наносят 1–2 капли фуксина Циля и нагревают над пламенем спиртовки до появления пара. При этом необходимо следить, чтобы раствор краски не подсох.

Краситель смывают водой и погружают препарат в стаканчик с 5%-ным раствором серной кислоты на 20–40 сек, после чего его сразу же промывают водой. При погружении в кислоту протоплазма клеток обесцвечивается, а споры остаются окрашенными.

На промытый препарат на 3–5 мин наносят метиленовую синь Лефлера (2–3 капли). После чего препарат тщательно промывают водой и высушивают.

При этом способе окраски споры окрашиваются в красный цвет, а клетки – в голубой.

Окраска бактерий по методу Грамма.

Сущность метода заключается в том, что бактерии последовательно окрашиваются красителем генцианвиолетом и йодом, а затем обрабатываются спиртом. При этом одни бактерии – грамположительные – остаются окрашенными, а другие – грамотрицательные – обесцвечиваются.

Это связано с тем, что у грамположительных бактерий проникшая в них краска при обработке спиртом не вымывается и удерживается в протоплазме клетки, а у грамотрицательных вымывается из клетки. В результате этого грамотрицательные бактерии обесцвечиваются и на последующем этапе окрашиваются фуксином, приобретая красный цвет.

Для проведения окраски готовят мазок.

На фиксированный мазок кладут полоску фильтровальной бумаги, наносят на нее в том месте, под которым находится мазок, 3–4 капли раствора генцианвиолета и при помощи пинцета разглаживают бумагу, плотно прижимая ее к стеклу. Через 2

минуты бумагу снимают, а излишки краски смывают водой.

На мазок наносят 3–4 капли раствора Люголя (раствор йода в йодистом калии) и по истечении 2 минут сливают его.

Препарат погружают в стаканчик с 96%-ным спиртом на 30–40 сек и сразу же после этого промывают водой.

Наносят на препарат на 2 мин разбавленный раствор фуксина, после чего промывают его водой и просушивают.

При этом способе окраски грамположительные бактерии будут фиолетовыми, а грамотрицательные – красными, т. е. после обесцвечивания спиртом они окрашиваются фуксином. Внимание! При недостаточной обработке мазка спиртом все клетки сохраняют свою окраску, а при избыточной все обесцвечиваются.

5 Микроскопирование окрашенных препаратов

Окрашенные препараты последовательно микроскопируют сначала с объективом 8 или 10х, а затем наносят на них каплю иммерсионного масла и микроскопируют с объективом 90 или 100х. Увиденное в микроскоп (при работе с объективом 90 или 100х) зарисовывают в тетради. Делают выводы о наличии у микроорганизмов спор и об их отношении к окраске по Граму.

6 Вопросы для самоконтроля

1. Как приготовить препарат типа «раздавленная капля»?
2. Как приготовить препарат типа «висячая капля»?
3. Как приготовить мазок?
4. Для чего проводят фиксацию мазка?
5. Какие методы окраски называются простыми, а какие сложными?
6. Как проводят окраску бактерий простым способом?
7. На чем основана окраска спор бактерий и как ее проводят?
8. На чем основана окраска окраску бактерий по методу Грама и как ее проводят?

9. Какой цвет имеют грамположительные и грамотрицательные бактерии?

Лабораторная работа № 4. Питательные среды

1. Цель работы

1.1. Изучить основы и технику приготовления питательных сред.

2. Задание

2.1. Изучить основы приготовления питательных сред.

2.2. Ознакомиться с основными требованиями, предъявляемыми к питательным средам.

2.3. Приготовить питательные среды:

- мясопептонный бульон (МПБ) или рыбопептонный бульон (РПБ);
- мясопептонный агар (МПА) или рыбопептонный агар (РПА);
- среду Сабуро;
- среду Кесслер;
- желточно-солевой агар.

2.4. Оформить отчет и сделать выводы.

3. Теоретическая часть

От всех других организмов микроорганизмы отличаются огромной скоростью потребления питательных веществ. Питательные вещества – это вещества, которые поступают в клетку из окружающей среды и используются микроорганизмом для синтеза собственных органических соединений и получения энергии.

Установлено, что за сутки количество поступающих в бактериальную клетку веществ в 20 раз больше ее массы. Это свидетельствует о высокой интенсивности обмена веществ у микроорганизмов. Специальных органов питания микроорганизмы не имеют. Питательные вещества поступают в клетку через всю ее поверхность.

Среды, на которых выращиваются микроорганизмы и из ко-

торых они получают питательные вещества, получили название питательных сред. В микробиологической практике питательные среды используют для выделения микроорганизмов и изучения их свойств.

В состав питательных сред, применяемых для выращивания бактерий, входят необходимые для построения белков, жиров, углеводов и нуклеиновых кислот биогенные элементы: углерод, азот, водород, кислород, сера и фосфор. В них также должны содержаться неорганические соединения, содержащие натрий, магний, железо, кальций и микроэлементы: кобальт, никель, бор, цинк, молибден, медь и др. Все перечисленные элементы должны находиться в питательной среде в усвояемых соединениях для данного микроорганизма.

Питательная среда должна содержать много воды, т. к. питательные вещества поступают в микробную клетку по законам осмоса и диффузии только в растворенном состоянии. Кроме этого, за счет воды микроорганизмы удовлетворяют свои потребности в ионах водорода и кислорода. При этом требования различных микроорганизмов к содержанию воды в среде неодинаковы.

Различные микроорганизмы усваивают азот из разных источников. У одних микроорганизмов источником азота являются минеральные вещества (аммонийные соединения), другие нуждаются в аминокислотах, а третьи используют высокомолекулярные пептоны, представляющие собой продукты неполного гидролиза белков. Строго паразитические виды бактерий развиваются только в присутствии белка.

Источником углерода для бактерий являются, главным образом, различные углеводы: сахар, многоатомные спирты, органические кислоты и их соли.

Потребность бактерий в неорганических веществах удовлетворяется прибавляемыми к питательной среде различными солями: NaCl , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 и др. Микроэлементы необходимы бактериям в ничтожно малых количествах. Они поступают в питательную среду с пептоном, неорганическими солями и водой.

Наряду с перечисленными органическими и неорганическими элементами некоторые бактерии нуждаются в ростовых факторах, которыми являются аминокислоты, витамины, пуриновые и пиримидиновые основания, органические кислоты.

Ростовые вещества нужны микроорганизмам в ничтожно малых количествах (мкг/л). Их источниками являются вытяжки из органов и тканей животных и растений.

Питательные вещества могут усваиваться микроорганизмами только при определенной реакции питательной среды, так как от рН зависит проницаемость клеточной стенки и цитоплазматической мембраны.

По своему происхождению среды бывают *естественными*, *искусственными* и *синтетическими*. Естественные или натуральные среды состоят из веществ растительного и животного происхождения. Это могут быть ткани различных организмов или экстракты из них. На таких средах культивируют различные виды микроорганизмов, т.к. они являются полноценными и содержат в основном все необходимые для их развития компоненты.

Искусственные среды готовят из естественных субстратов с добавлением в них различных веществ, например, пептона, соли и т.д. Синтетические среды готовят из химически чистых органических и неорганических соединений, которые берутся в строго определенных концентрациях и пропорциях. Поэтому состав этих сред, в отличие от естественных, всегда точно известен. Эти среды используют в основном для изучения обмена веществ.

Таким образом, питательные среды, используемые в микробиологической практике, должны отвечать определенным требованиям. Они должны:

1. Содержать необходимые для питания микроорганизма питательные вещества;
2. Их среда должна иметь рН оптимальную для выращивания определенного вида микроорганизмов;
3. Иметь достаточную влажность, так как поступление питательных веществ в микробную клетку идет по законам осмоса и диффузии.
4. Быть стерильными, обеспечивая возможность выращивания чистых культур микроорганизмов.

Состав питательных сред определяется потребностями микроорганизмов, которые на этой среде будут расти. Поскольку

потребности в питательных веществах у разных микроорганизмов различны, существует множество разнообразных сред, которые используются для их культивирования.

Универсальных сред, на которых бы развивались абсолютно все микроорганизмы, не существует.

По своему назначению питательные среды подразделяются на среды *общего назначения* и *специальные*.

На средах *общего назначения* (стандартные среды) можно культивировать различные виды микроорганизмов. К ним относятся мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), мясопептонный желатин (МПЖ). Среда общего назначения применяют также в качестве основы для приготовления специальных сред, добавляя к ним кровь, сахар, молоко и другие компоненты, необходимые для развития соответствующего микроорганизма.

К специальным питательным средам относятся *элективные* (избирательные) и *дифференциально-диагностические*.

Элективные (избирательные) среды предназначены для культивирования определенного вида организмов. Принцип создания элективных питательных сред основан на максимальном соответствии состава среды основным биохимическим и энергетическим потребностям конкретного вида микроорганизма. На такой среде создаются оптимальные условия для выращивания одного или нескольких видов микроорганизмов.

При посеве на элективные среды микроорганизмов разных видов тот вид, для которого данная среда является элективной, будет расти и образовывать колонии, наиболее быстро.

Дифференциально-диагностические питательные среды используются для определения видовой принадлежности микроорганизмов на основе особенностей их обмена веществ. По своему назначению дифференциально-диагностические питательные среды подразделяются следующим образом:

- среды для выявления протеолитической способности микроорганизмов, содержащие в своём составе белковые вещества: кровь, молоко, желатин и т. д.

- среды с индифферентными химическими веществами, которые служат источником питания для одних видов микроорга-

низмов и не усваиваются другими видами.

– среды для выявления сахаролитической способности, содержащие в своем составе углеводы и многоатомные спирты.

– среды для определения редуцирующей способности микроорганизмов.

В состав дифференциально-диагностических сред, предназначенных для выявления сахаролитических и окислительно-восстановительных ферментов микроорганизмов, входят различные индикаторы (метиленовый синий, кислый фуксин, бром тимоловый синий и др.). При изменении pH, индикатор изменяет свою окраску, что указывает на изменение состава среды в результате расщепления, окисления или восстановления входящих в среду веществ.

В тоже время многие среды, используемые для выявления протеолитических ферментов, индикатор не содержат, т. к. их наличие определяют по изменению агрегатного состояния входящих их состав компонентов: разжижению желатина, коагуляции яичного или сывороточного белка.

По консистенции питательные среды бывают жидкими, плотными и сыпучими.

Жидкие среды состоят из воды и растворенных в ней веществ, например, мясопептонный бульон и практически все синтетические среды. Их применяют для накопления биомассы или продуктов обмена и сохранения культур микроорганизмов, плохо развивающихся на плотных питательных средах.

Плотные питательные среды готовят из жидких путем добавления к ним, связывающих воду веществ: агар-агара или желатина. Агар-агар это полисахарид растительного происхождения, добываемый из морских водорослей. Он растворяется в воде при температуре 80–86°C, а застывает при 36–40°C.

Применение агаровых сред сохраняющих плотную консистенцию при температуре 37°C позволяет выращивать бактерии на плотных средах при оптимальной для большинства из них температуре.

Желатин вещество белковой природы животного происхождения. При температуре 32–34°C он набухает и растворяется в

воде. При более низкой температуре превращается в гель.

Плотные среды широко используются для культивирования микроорганизмов, выделения чистых культур, количественного учета микроорганизмов и т. д.

Сыпучие питательные среды применяют в промышленной микробиологии для культивирования некоторых микроорганизмов – продуцентов биологически активных соединений. Такими средами являются отруби, разваренное пшено и др.

Качество питательных сред во многом определяет результаты микробиологического исследования. Их приготовление является одним из наиболее ответственных и трудных участков работы микробиологической лаборатории. Поэтому в настоящее время все большее применяются сухие питательные среды.

Сухие питательные среды представляют собой порошки, которые находятся в упаковке, на которой имеется пропись их приготовления. Для приготовления среды их согласно прописи отвешивают в необходимом количестве, растворяют в воде, кипятят, устанавливают необходимое значение рН и стерилизуют.

Наряду с основной, наиболее распространенной средой – мясопептонным агаром, производится много специальных питательных сред сложного состава для выделения и культивирования различных групп микроорганизмов. Например, среды ряда Гиса для изучения сахаролитической способности микроорганизмов, среды Кесслер, Хейфица и Эндо для выделения бактерий группы кишечной палочки и др.

Сухие питательные среды поступают в продажу в стеклянных банках с плотно завинчивающимися пластмассовыми крышками. В таком виде они должны храниться и в лаборатории.

Приготовление любой питательной среды начинается с изучения ее прописи, подбора необходимых компонентов и варки среды.

Определение рН питательных сред . Его можно проводить разными способами. Наиболее часто рН определяют электрометрическим способом на потенциометрах различных марок или при помощи специальной индикаторной бумаги, градация которой соответствует 0,2–0,3 значениям рН.

При необходимости корректировки рН в сторону его увели-

чения в среду по каплям, осторожно, при постоянном перемешивании, добавляют щелочь ($2n \text{ NaOH}$). Если же pH нужно понизить добавляют кислоту ($2n \text{ HCl}$ или лимонную кислоту).

Фильтрация питательных сред. Питательные среды, в состав которых входит агар, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, жидкие и желатиновые среды – через фильтровальную бумагу. Питательные среды с агаром и желатином фильтруют горячими.

Для фильтрации жидких сред берут бумажный фильтр и подгоняют его по диаметру воронки. Между фильтром и воронкой не должно быть зазоров, иначе среда будет фильтроваться очень долго. Чтобы фильтр не выскакивал из воронки, его смачивают дистиллированной водой. Затем берут плоскодонную колбу, вставляют в нее воронку с фильтром и начинают фильтровать.

Для фильтрации агаровых сред готовят ватно-марлевый фильтр. Предварительно вырезают квадратный кусок марли такого размера, чтобы его сторона была немного больше, чем двойная глубина воронки. Марлю кладут на воронку, сверху на нее помещают достаточно плотный слой гигроскопической ваты. Все это прижимают к стенкам воронки и также как при бумажном фильтре немного смачивают дистиллированной водой.

Осветление питательных сред. Его применяют в том случае, если при приготовлении среды она потемнела или помутнела. Существует несколько различных способов осветления, которые основаны на процессах коагулирования взвешенных частиц и на их адсорбции.

Фильтрацию и осветление можно заменить отделением осадка путем отстаивания (декантацией). Для этого расплавленную среду с агаром высоким слоем наливают в химический стакан и оставляют в горячем (выключенном!) автоклаве на ночь, для оседания взвешенных частиц на дно стакана.

На следующий день застывшую питательную среду достают из стакана (для этого его слегка нагревают и переворачивают) и срезают мутную придонную часть.

Разливка питательных сред. Приготовленные питательные среды разливают в колбы, пробирки или чашки Петри. Разливают как стерильные, так и не стерильные питательные среды.

Стерильные среды разливают только в стерильную посуду, не стерильные – в чистую, но не стерильную посуду, т.к. после разлива посуда со средой будет стерилизоваться.

До стерилизации обычно разливают среды, которые затем стерилизуются паром под давлением (1 атм, по манометру). Не стерильные среды никогда не разливают в чашки Петри. Их разливают и стерилизуют только в пробирках.

Для разливки жидких питательных сред собирают небольшую установку. В штативе закрепляют бюретку, в верхний конец которой вставляют воронку. Ее нижний конец заканчивается пипеткой, соединенной с бюреткой резиновой трубкой со стеклянным шариком, или надетым на нее зажимом Мора. Под пипетку подставляют посуду, в которую разливается среда (колбы, пробирки) и, надавливая на шарик или раздвигая зажим, наливают среду. Так как для разлива используется бюретка, можно разливать точный объем среды.

При разливе среды надо следить за тем, чтобы она не попала на края посуды, и они оставались сухими. В противном случае ватно-марлевые пробки, которыми закрываются колбы и пробирки, приклеиваются к стенкам посуды и вынимаются с трудом.

Разлив плотных стерильных питательных сред в стерильные чашки Петри проводят при необходимости проведения посева на поверхность среды. Предварительно среду расплавляют на водяной бане до такого состояния, чтобы в ней не было комков, а чашки Петри ставят на край стола. Колбу (или пробирку) со средой берут в правую руку, левой рукой открывают над пламенем спиртовки пробку, держа ее между мизинцем и ладонью, и обжигают края колбы (или пробирки).

Большим, указательным и средним пальцем левой руки приоткрывают с одной стороны крышку на чашке Петри и наливают в нее питательную среду (около 10–15 мл). Закрывают крышку, быстрыми вращательными движениями распределяют среду равномерным слоем по дну чашки и оставляют до застывания.

Стерилизация питательных сред осуществляется различными способами и при различных режимах в зависимости от того, какие компоненты входят в состав среды.

Агаровые среды, не содержащие в своем составе белка и углеводов, и синтетические среды стерилизуют в автоклаве при температуре 115–120°C в течение 15–20 мин.

Среды, в состав которых входят углеводы, молоко (содержит лактозу) и желатин, стерилизуют дробно текучим паром или в автоклаве при температуре не выше 112°C.

Среды, в состав которых входят белки, стерилизуют фильтрованием через мембранные фильтры.

4. Практическая часть

Приготовление питательных сред начинается с их варки. Варку сред проводят в эмалированной или стеклянной посуде. Многие среды общего назначения готовятся на основе мясной или рыбной воды (бульона). Поэтому, прежде всего, готовят ее.

4.1. Приготовить мясную (рыбную) воду.

Для приготовления мясной воды берут парную нежирную говядину и удаляют из нее кости, жир и сухожилия. Разрезают на куски и пропускают через мясорубку. Полученный фарш заливают холодной водопроводной водой из расчета 1 дм³ воды на 0,5 кг фарша. Нагревают до кипения и кипятят, помешивая и снимая накипь, при небольшом нагреве в течение 1,5 часов.

После этого бульон охлаждают для застывания жира и удаляют его. Полученный раствор фильтруют через ватно-марлевый фильтр до полной его прозрачности. В фильтрат отжимают и весь сок из вареного фарша. Полученный бульон доводят кипяченой водой до первоначального объема, разливают в чистую стеклянную посуду, закрывают ватными пробками и стерилизуют в автоклаве в течение 20 мин при температуре 120°C.

Для приготовления рыбной воды берут нежирную рыбу, (минтай, треску и др.) отделяют мясо, разрезают его на куски и пропускают через мясорубку. Полученный фарш заливают холодной водопроводной водой из расчета 1 дм³ воды на 0,5 кг фарша, медленно нагревают до кипения и кипятят в течение 1,5 часов.

Для определения готовности рыбной воды небольшое ее количество фильтруют через бумажный фильтр, если фильтрат

прозрачный, то вода считается готовой. После чего весь полученный раствор процеживают через ватно-марлевый фильтр или полотно, сюда же отжимают весь сок из вареного фарша, доливают водой до первоначального объема, разливают в стеклянные колбы, закрывают ватными пробками и стерилизуют в автоклаве в течение 20 мин при температуре 120°C.

4.2. Приготовить мясопептонный или рыбопептонный бульон (МПБ или РПБ).

К 1 дм³ мясной или рыбной воды (приготовленной как указано пункте 4.1) добавляют 10 г пептона, 5 г хлорида натрия и хорошо перемешивают. Определяют рН раствора и прибавляя щелочь (2н NaOH) или кислоту (2н соляную или лимонную), устанавливают его значение равное 7,0–7,2. Кипятят при слабом нагреве до полного растворения всех компонентов (не более 10–15 мин). После чего фильтруют через бумажный фильтр.

При необходимости полученный бульон осветляют. Для этого один белок свежего куриного яйца взбивают в пену с двойным объемом холодной воды и прибавляют к 1 л среды, температура которой около 50°C. Хорошо перемешивают и кипятят при сильном нагреве 10 мин. После чего отфильтровывают.

Внимание! Иногда, при добавлении белка, помутнение среды становится еще больше, поэтому сразу прибавлять белок ко всему бульону нельзя. Надо провести проверочную реакцию с небольшим его количеством.

После этого бульон стерилизуют в автоклаве при температуре 120°C в течение 20 мин. В случае выпадения осадка бульон вторично фильтруют с последующей стерилизацией.

4.3. Приготовить мясопептонный или рыбопептонный агар (МПА или РПА)

Мясопептонный и рыбопептонный агар можно использовать для культивирования большинства бактерий. Они готовятся на основе мясной или рыбной воды.

К 1 дм³ мясной (рыбной) воды добавляют 10 г пептона,

5 г хлорида натрия и кипятят при слабом нагреве до полного растворения всех компонентов. Полученный бульон фильтруют через бумажный фильтр, прибавляя щелочь (2н NaOH) или кислоту (2н HCl) устанавливают рН равное 7,2–7,4.

После чего добавляют 15–20 г измельченного агар-агара и кипятят на слабом нагреве при постоянном перемешивании до полного растворения агар-агара.

При помутнении среды ее осветляют одним из указанных выше способов. Затем (в горячем состоянии!) фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в колбы или пробирки и стерилизуют в автоклаве при температуре 120°C в течение 20 мин.

Мясопептонный агар можно также приготовить из сухой питательной среды, согласно прописи, указанной на упаковке.

4.4. Приготовить среду Сабуро

Среда Сабуро используется для выделения и культивирования плесневых грибов и дрожжей.

В 1 дм³ горячей дистиллированной воды растворяют 10 г пептона и 40 г глюкозы или мальтозы. Затем добавляют 15–20 г измельченного агар-агара и кипятят на слабом нагреве при постоянном перемешивании до полного его растворения. Прибавляя кислоту (2н HCl) устанавливают рН среды 5,5–6,0.

В горячем состоянии среду фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в колбы и стерилизуют в автоклаве при температуре 112°C в течение 20 мин.

4.5. Приготовить среду Кесслер

Среда Кесслер используется для определения бактерий группы кишечных палочек (колиформных).

К 1 дм³ дистиллированной воды добавляют 10 г пептона и 50 см³ бычьей желчи. Смесь кипятят на водяной бане при помешивании в течение 20–30 мин, затем фильтруют через ватно-марлевый фильтр.

В фильтрат добавляют 2,5 г лактозы и, прибавляя дистиллированную воду, доводят объем до 1 дм³. Устанавливают рН 7,4–7,6 и добавляют 2 см³ 1% раствора генцианвиолета. Перемешивают и разливают по 8–10 см³ в чистые пробирки с поплавками.

Среду стерилизуют в автоклаве при температуре 120°C в течение 10 мин. Готовая среда имеет темно-фиолетовый цвет.

Среду Кесслер с лактозой можно приготовить и из сухой питательной среды согласно прописи, указанной на этикетке.

4.6. Приготовить желточно-солевой агар

Желточно-солевой агар используется для выявления золотистого стафилококка. Его готовят на основе мясопептонного или рыбо-пептонного агара.

На водяной бане расплавляют 1 дм³ стерильного МПА или РПА и добавляют к нему 100 г хлорида натрия (рН 7,2). Охлаждают его до 45°C и, соблюдая стерильность, добавляют 200 см³ стерильной желточной эмульсии. Смесь тщательно перемешивают и разливают в стерильные чашки Петри. Среду можно хранить в холодильнике не более 5 суток.

Для приготовления желточной эмульсии поверхность яйца протирают 96%-ным этиловым спиртом, соблюдая все меры асептики, извлекают желток и смешивают его с 200 см³ стерильного физиологического раствора.

5. Вопросы для самоконтроля

1. Какие компоненты должны входить в состав питательных сред?
2. Каким требованиям должны соответствовать питательные среды?
3. На какие группы делятся питательные среды:
4. по происхождению;
5. по назначению;
6. по консистенции?
7. Для чего используются элективные среды?
8. Для чего используются дифференциально-диагностические среды?
9. Как проводят фильтрацию жидких и плотных питательных сред?
10. Как проводят осветление питательных сред?
11. Как проводят разлив питательных сред?
12. Как проводят стерилизацию питательных сред?
13. Как приготовить мясную (рыбную) воду?

14. Как приготовить МПБ и МПА?

Лабораторная работа № 5. Посев на плотные и жидкие питательные среды

1. Цель работы

1.1. Научиться проводить посев на плотные и жидкие питательные среды, выделять чистые культуры бактерий и определять культуральные признаки микроорганизмов.

2. Задание

Занятие 1.

2.1. Ознакомиться с техникой взятия материала на посев и методами посева.

2.2. Провести посев в жидкую питательную среду.

2.3. Провести посев на плотные питательные среды:

- на скошенный мясопептонный агар;
- уколом в столбик питательной среды;
- на поверхность плотной питательной среды в чашке

Петри;

- в толщу плотной питательной среды в чашке Петри.

2.4. Провести выделение чистой культуры микроорганизмов:

- методом посева в глубину среды;
- по методу Дригальского.

2.5. Поставить посевы на термостатирование.

Занятие 2.

2.6. Изучить посевы микроорганизмов, сделанных на предыдущем занятии, и определить их культуральные признаки.

2.7. Приготовить мазки и окрасить их по методу Грама.

2.8. Микроскопировать полученные препараты.

2.9. Сделать выводы.

3. Теоретическая часть

Посев – это внесение исследуемого материала микроорганизмов в стерильную питательную среду. Пересев – это перенос части, выращенной на питательной среде, культуры микроорга-

низма, на другую стерильную питательную среду. Посев и пересев всегда проводят вблизи от зажженной спиртовки.

Материалом для посева чаще всего являются чистые культуры не патогенных или условно-патогенных микроорганизмов. Можно также использовать бактерии, пересеваемые с различных сред: продуктов питания, воды, почвы, воздуха и т.д.

Жидкий материал для посева берут стерильной петлей или пипеткой. При взятии петлей жидкость должна образовывать в кольце петли прозрачную пленку – «зеркало». Пипетки используют в том случае, когда материал засевают в большом количестве или в точно отмеренном объеме.

Иногда материал, который используется для посева, распределяется в жидкости неравномерно, образуя поверхностно плавающую пленку или придонный осадок. В таких случаях для посева нужно взять небольшую частицу пленки или несколько крупинок осадка.

Способ взятия материала для посева с плотной среды определяется ее консистенцией. При взятии материала из структур, которые имеют плотную консистенцию, их поверхность прижигают раскаленным ножом или скальпелем. На обожженной поверхности делают подрез и из середины исследуемого материала вырезают стерильными ножницами или скальпелем кусочек ткани.

Из органов мягкой или рыхлой консистенции материал для посева берут петлей. Кусочки взятого для посева материала опускают в жидкую питательную среду или растирают в стерильной ступке, получая кашеобразную массу, используемую для посева. С плотной питательной среды материал для посева можно брать также иглой.

Техника посева зависит от консистенции питательной среды, качества засеваемого материала и цели исследования. Все посева производят в боксе или лабораторной комнате, в которой в этот период времени ограничивается движение персонала.

Все манипуляции, связанные с посевом и выделением микробных культур, производят над пламенем спиртовки. Непосредственно перед взятием материала бактериальную петлю прокаливают над пламенем, затем ее остужают, потирая о внут-

ренную стенку пробирки или поверхность крышки от чашки Петри, и проверяют, достаточно ли она охладилась. Для этого при пересеве микробной культуры из пробирки петлю погружают в конденсационную жидкость или, при посеве из чашки Петри, прикасаются к поверхности питательной среды, свободной от микроорганизмов. Остуженная петля не вызывает изменения конденсата и не расплавляет питательный агар. Окончив посев, петлю прожигают повторно для уничтожения оставшихся на ней микроорганизмов, и ставят в штатив.

Шпатели, используемые для посева, также, как и бактериальные петли, перед посевом прожигают. Пипетки стерилизуют в завернутом состоянии в сушильном шкафу. После проведения посева шпатели и пипетки опускают в дезинфицирующий раствор.

Чистой культурой называется популяция микроорганизмов одного вида, полученная из изолированной микробной колонии. Под микробной колонией подразумевается потомство бактерий, возникающее в результате размножения одной микробной клетки. Выделение чистой культуры микробов является обязательным этапом всякого бактериологического исследования.

Получение чистых культур необходимо для изучения морфологических, культуральных, биохимических и физиологических свойств, по совокупности которых определяется видовая принадлежность микроорганизмов. Чистые культуры микроорганизмов широко используются в технологии производства многих пищевых продуктов (сыры, хлеб, кисломолочные продукты и т. д.).

Для выделения чистых культур микроорганизмов из материалов, содержащих смешанную микрофлору, существует много различных методов. Наибольшее распространение получили методы механического разъединения микроорганизмов, находящихся в исследуемом материале, с целью получения изолированных колоний на поверхности или в глубине питательной среды.

Колония – это изолированное скопление клеток одного вида, выросших из одной клетки.

При выделении чистых культур широко применяются элективные питательные среды, стимулирующие развитие тех

микроорганизмов, чистую культуру которых выделяют.

Существующие методы получения чистых культур микроорганизмов, различаются между собой способами получения отдельных клеток микроорганизмов. В микробиологической практике выделение чистых культур проводят методом истощающего посева в глубине среды (по Коху), методом Дригальского, методом фильтрации, с помощью микроманипулятора и др.

В настоящее время для выделения чистых культур микробов наиболее часто пользуются методом посева в глубине питательной среды (модификация пластинчатого метода Коха) и методом посева на поверхность питательной среды – методом Дригальского.

Существуют различные варианты метода Дригальского. При применении любого из них в каждую следующую чашку Петри вносят все меньшее количество микроорганизмов. При выращивании посевов клетки размножаются, и из каждой из них образуется масса клеток – колония.

Каждая обособленная колония представляет собой потомство одной клетки и поэтому является чистой культурой того вида, к которому принадлежала исходная клетка. Такие колонии хорошо видимы невооруженным глазом или их можно рассмотреть с помощью луп.

Завершающим этапом выделения чистых культур является пересев выросших на чашках Петри колоний в пробирки с жидкой питательной средой, которые являются накопительными. Накопительной называют такую культуру, в которой развиваются клетки микроорганизмов, относящиеся к одному виду. Для получения накопительной культуры необходимо соблюдать определенные условия выращивания: состав среды и ее pH, температуру, наличие или отсутствие кислорода и др.

Выделение и накопление чистых культур аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов проводят при доступе кислорода. Для культивирования строгих (облигатных) анаэробов необходимо создать условия, которые исключают доступ к ним кислорода воздуха, т. к. он оказывает на эти микроорганизмы токсическое действие. Другим обязательным условием, обеспечивающим выделение анаэробов из исследуемого материала, является внесение большого количества посевного материала в пи-

тательную среду.

Единственным отличием питательных сред, применяемых для выращивания анаэробов, является пониженное содержание в них свободного кислорода. Для создания бескислородных условий используют физические, химические и биологические факторы.

Самым простым способом удаления растворенного кислорода является кипячение. Непосредственно перед посевом материала пробирки с питательными средами кипятят в водяной бане в течение 10–20 мин. При кипячении из среды вытесняется воздух и, следовательно, удаляется кислород.

Свежую, прокипяченную питательную среду быстро охлаждают, погружая в лед или подставляя под струю холодной воды, чтобы не дать ей насытиться кислородом воздуха, и используют для посева. Для уменьшения диффузии кислорода из воздуха питательные среды заливают сверху стерильным вазелиновым или парафиновым маслом (слой 1–1,5 см). Засев среды проводят пипеткой сквозь масло в наклонном положении пробирки.

Культивирование анаэробов обычно осуществляют в специальных жидких питательных средах (Китт-Тароцци и др.), которые изолируют от доступа воздуха слоем вазелинового масла. Их можно выращивать также в толще плотной питательной среды.

В эти среды в качестве редуцирующих веществ добавляют глюкозу, аскорбиновую кислоту, гликокол и некоторые другие вещества или активно связывающие кислород животные ткани паренхиматозных органов. На этом свойстве животных тканей основано приготовление питательной среды Китт-Тароцци, широко применяемой для выращивания анаэробов.

В жидкие питательные среды помещают иногда пористые вещества: вату, пемзу, которые адсорбируют на своей поверхности пузырьки воздуха.

4. Практическая часть

Занятие 1.

4.1. Провести посев в мясопептонный бульон (МПБ)

Берут петлю, обжигают ее в пламени спиртовки, вводят

в емкость, в которой находятся микроорганизмы, охлаждают и берут материал для посева. Если материал для посева жидкий, его набирают в стерильную пастеровскую или градуированную пипетку. Петлю и пипетку держат тремя пальцами правой руки (большим, указательным и средним).

В левую руку берут пробирку с жидкой питательной средой и открывают пробку пальцами правой руки, прижав ее мизинцем к ладони или держа между безымянным пальцем и мизинцем. Осторожно вводят петлю или пипетку в пробирку с питательной средой и погружают в нее. Если материал вязкий и с петли не снимается, его растирают на стенке сосуда, а затем смывают жидкой средой. Из пипетки материал для посева вливают.

После проведения посева пробирку закрывают пробкой, проведенной над пламенем горелки, которую в течение всего посева держат в руке, и содержимое тщательно перемешивают, осторожно встряхивая, чтобы не замочить пробку, или вращая сначала в одну, затем в другую сторону. При посевах культур, растущих в виде поверхностной пленки, ее очень осторожно снимают и опускают на поверхность свежей питательной среды, не давая погрузиться вглубь.

Полученные посевы инкубируют в течение 24 часов при температуре 37°C.

4.2. Провести посев петлей на поверхность среды в чашке Петри.

При проведении посева на поверхность плотной питательной среды в чашки Петри чашка стоит на столе.левой рукой приоткрывают ее крышку с одной стороны так, чтобы в щель могла пройти петля, на которой находится материал для посева. Небольшое количество исследуемого материала втирают бактериальной петлей в поверхность питательной среды. Посев делают одним из трех способов:

- штрихом – петлей проводят зигзагообразную линию, свободно скользя по поверхности среды от одного края чашки Петри к другому;
- чертой – проводят петлю по прямой линии посередине питательной среды;
- сплошной – растирают материал непрерывными круго-

выми движениями петли по всей поверхности среды.

Затем петлю осторожно вынимают из чашки Петри так, чтобы не задеть ее край, и закрывают ее. Прокаливают петлю в пламени спиртовки и ставят ее на место.

Полученные посевы инкубируют 24 часа при температуре 37°C.

4.3. Провести посев на скошенный мясопептонный агар

При посеве на скошенный мясопептонный агар, в правой руке, как писчее перо, держат петлю, предварительно прокаленную в пламени спиртовки и охлажденную, с взятым для посева материалом.

Пробирку со стерильной питательной средой берут в левую руку. Держат ее в наклонном положении между большим и указательными пальцами левой руки так, чтобы ее основание находилось над поверхностью кисти руки.

Мизинцем и безымянным пальцем правой руки из пробирки, которую держат над пламенем спиртовки, вынимают пробку, держа ее за наружный конец и не прикасаясь к той части, которая входит внутрь пробирки, и обжигают края пробирки. Внимательно следят за тем, чтобы пробка, находящаяся в руке ни к чему не прикасалась.

Петлю с материалом для посева вносят в пробирку и, стараясь не задеть стенок пробирки, опускают до дна, где в уголке скапливается небольшое количество конденсационной воды. Посев делают на поверхность питательной среды чертой, штрихом или сплошной.

После этого петлю осторожно вынимают из пробирки и, не выпуская ее из рук, обжигают в пламени спиртовки горлышко пробирки и внутренний конец пробки, после чего пробирку закрывают и ставят в штатив. Затем прокаливают и ставят на место петлю.

Пересев культуры из одной пробирки в другую осуществляется аналогично. Только в левую руку берут сразу две пробирки, а правой рукой (мизинцем и безымянным пальцем) вынимают сразу две пробки.

Полученный посев инкубируют 24 часа при температуре

37°C.

4.4. Провести посев шпателем на поверхность питательной среды в чашке Петри

Крышку стоящей на столе чашки Петри приоткрывают левой рукой, вводят в нее петлю с исследуемым материалом и наносят его на поверхность питательной среды у края чашки Петри. Затем петлю вынимают из чашки, обжигают и ставят на место.

В правую руку берут стерильный шпатель и, приоткрыв крышку, вносят его в чашку Петри. Шпатель кладут плашмя на питательную среду в то место, куда внесли исследуемый материал, и круговыми движениями распределяют его равномерно по всей поверхности среды.

После чего шпатель осторожно вынимают из чашки Петри так, чтобы не задеть ее край, и закрывают ее. Шпатель прокалывают в пламени спиртовки и ставят на место или помещают в дезинфицирующий раствор.

Полученный посев инкубируют 24 часа при температуре 37°C.

4.5. Провести посев исследуемого материала в толщу плотной питательной среды в чашке Петри

Материал, засеваемый в толщу питательной среды, должен быть в жидком состоянии. Для этого из материала, подлежащего посеву, готовят взвесь (в стерильной воде или физиологическом растворе), которую, в зависимости от предполагаемого микробного загрязнения, набирают в стерильную пипетку в объеме 0,1, 0,5 или 1 мл, и выливают с пустую стерильную чашку Петри.

После этого в чашку наливают, слегка приоткрыв ее, 10–15 мл предварительно расплавленного и остуженного до 40–45°C мясопептонного агара. Температуру агара определяют при помощи руки. Если руку приложить к колбе со средой, она не должна отдергиваться – колба не должна вызывать ощущение ожога.

Для равномерного распределения материала в среде чашку Петри пальцами прижимают к столу и делают круговые враще-

ния, следя за тем, чтобы содержимое чашки не попало на крышку.

Полученный посев инкубируют 24 часа при температуре 37°C.

4.6. Провести посев уколом в столбик питательной среды

Посев уколом в столбик делается иглой. В правую руку берут иглу, держа ее как писчее перо, прокалывают в пламени спиртовки и охлаждают. После чего набирают материал для посева.

Пробирку, в которую будет проводиться посев, с питательной средой (с мясопептонным агаром, желатином и др.) застывшей в виде столбика, берут в левую руку. Не выпуская из рук иглу, свободными пальцами правой руки (мизинцем и безымянным) открывают пробку, прижав ее мизинцем к ладони или держа между безымянным пальцем и мизинцем.

Иглу вносят внутрь пробирки и прокалывают ею среду по середине, вводя находящийся на ней материал до дна пробирки. После чего иглу быстро вынимают и закрывают пробирку пробкой. Иглу прокалывают и ставят на место.

Полученный посев инкубируют 24 часа при температуре 37°C.

4.7. Выделить чистую культуру микроорганизмов

Выделение чистой культуры методом посева в глубину и на поверхности питательной среды основано на механическом разъединении и уменьшении микроорганизмов, с целью получения изолированных колоний при их росте на плотной питательной среде. Количество микроорганизмов, содержащихся в исследуемом материале, предугадать заранее трудно, поэтому для посева пользуются не одной, а несколькими пробирками и чашками.

4.7.1. Выделение чистой культуры методом посева в глубине среды

Берут 3–5 пробирок, в которых находится по 10–15 мл мя-

сопептонного агара и расплавляют их содержимое на водяной бане. Пробирки с расплавленной средой охлаждают до 43–45°C и ставят в теплую воду, чтобы предупредить застуднение среды. В одну из пробирок пипеткой или петлей вносят небольшое количество исследуемого материала микроорганизмов и тщательно его перемешивают.

Для лучшего перемешивания материала со средой засеянную пробирку вращают несколько раз, зажав между ладонями. После этого стерильной петлей берут небольшое количество содержимого 1-й пробирки и переносят во 2-ю. Затем таким же образом из 2-й в 3-ю и т.д. Засеянные пробирки со средой хорошо перемешивают, зажав их между ладонями (вращают несколько раз в одну и в другую сторону). Приготовленные таким образом разведения бактерий выливают из пробирок в стерильные чашки Петри, обозначенные номерами, соответствующими номерам пробирок.

После загустевания среды чашки помещают в термостат на 24 часа при температуре 37°C.

Количество выросших в чашках Петри колоний будет уменьшаться по мере увеличения разведения взятого на посев материала.

4.7.2. Выделение чистой культуры по методу Дригальского

Расплавленную стерильную питательную среду разливают в 3 чашки Петри слоем не менее 0,5 см толщины. Застывшую среду обязательно подсушивают, так как влажная поверхность способствует образованию сливающегося роста.

В первую чашку петлей вносят небольшое количество исследуемого материала и стерильным шпателем втирают его в поверхность питательной среды. Далее, не прожигая шпателя и не набирая нового материала, шпатель переносят сначала во вторую, а затем и третью чашки, втирая в поверхность питательных сред оставшийся на нем материал.

Вместо шпателя можно пользоваться бактериальную петлю. Для этого ее с небольшим количеством микроорганизмов кладут плашмя на питательную среду, и проводят, не повреждая поверхности, параллельные штрихи по всей среде или по секто-

рам, разделив дно чашки (если среда прозрачна) на 4 или 8 равных частей.

Штрихи можно проводить в двух взаимно перпендикулярных направлениях. Нужно стараться, чтобы штрихи, наносимые петлей, располагались как можно ближе друг к другу, так как это удлиняет линию посева и дает возможность получить изолированные колонии микробов. При таком способе посева материал, находящийся на петле, расходуется постепенно, и по линиям сетки, нанесенным в конце посева, вырастают изолированные колонии микробов.

Занятие 2.

Изучить морфологические и культуральные признаки микроорганизмов.

Культуральные признаки микроорганизмов устанавливаются по характеру роста культуры изучаемого микроорганизма, на плотных и жидких питательных средах (МПА, МПЖ и др.). Будучи постоянными для каждого вида, они являются важным диагностическим признаком. Для этого полученные посевы исследуют и проводят их описание.

Микроорганизмы, выращиваемые на плотных питательных средах, образуют хорошо видимые невооруженным глазом колонии. Поэтому чашки с посевом просматривают, сначала невооруженным глазом или через лупу. Затем их помещают на столик микроскопа, вверх дном и просматривают колонии в проходящем свете с объективом малого увеличения и с суженной диафрагмой.

При большом количестве бактерий они растут в виде пленки, покрывающей всю поверхность питательной среды. Такой характер микробного роста получил название сплошного или газонного. Посев газоном производят в том случае, когда нужно получить большое количество микробной культуры одного вида.

При посеве уколом в столбик культура растет по линии укола, образуя стержень различной формы. При выращивании на МПБ бактерии в большинстве случаев вызывают помутнение среды.

Характер роста колоний изучают при помощи лупы или при малом увеличении микроскопа. Для микроскопирования колоний чашку Петри с агаровой культурой помещают дном вверх на предметный столик микроскопа, рассматривают и делают описание колоний.

Морфологические признаки исследуют при микроскопировании прижизненных или фиксированных препаратов, определяя форму и размеры клеток, их подвижность, наличие капсулы и включение, способности к спорообразованию, отношение к окраске по Граму.

4.8. Рост микроорганизмов на жидких питательных средах

При описании роста микроорганизмов на жидких питательных средах, в частности на МПБ, характеризуют помутнение среды; количество, характер и цвет осадка; образование пленки на поверхности среды; наличие пристеночного кольца и его характер. Для анаэробов отмечают еще и наличие газообразования. Различают:

- рост бактерий с равномерным помутнением среды, цвет которой остается неизменным или изменяется в соответствии с цветом водорастворимого пигмента, образующегося в культуре микроорганизмов;

- придонный рост бактерий характеризуется образованием осадка на дне пробирки. Он наблюдается у бактерий с анаэробным типом дыхания. Осадок может быть однородным или неоднородным; скудным точечным или обильным, волокнистым или хлопьевидным; по консистенции вязким, слизистым, зернистым или пастообразным. Питательная среда над осадком может быть прозрачной или мутной. Если культура пигмента не образует, цвет среды не изменяется, а осадок имеет серовато-белый или желтоватый цвет;

- пристеночный рост бактерий. Бактерии растут, прикрепляясь к внутренней поверхности стенок пробирки, образуя плотные зерна или рыхлые хлопья. При таком росте питательная среда, находящаяся в пробирке, обычно остается совершенно прозрачной. При росте микроорганизмов на стенках сосуда на

границе жидкости с воздухом происходит образование пристеночного кольца. Оно плотно прикреплено к стенкам и поэтому обнаруживается при наклоне пробирки. Оно может быть узкое и широкое, тонкое и толстое, ровное и узловатое;

– поверхностный рост бактерий характеризуется образованием на поверхности среды пленки, внешний вид и характер которой могут быть различны:

а) пленка тонкая, нежная, бесцветная, имеет вид едва заметного налета, исчезающего при встряхивании пробирки и взбалтывании среды;

б) пленка влажная, толстая, хорошо видимая простым глазом, вязкой, слизистой консистенции, прилипает и тянется за петлей;

в) пленка плотная, сухая, внешним видом напоминает кусочки кожи и при попытке взятия из нее материала снимается целиком в виде круглого диска;

г) пленка плотная, сухая, со сморщенной, а иногда бородавчатой поверхностью и краями, прикрепленная к стенкам пробирки. При взбалтывании жидкости или прикосновении бактериальной петли разбивается на кусочки, погружающиеся вглубь жидкости.

Цвет пленки, как и питательной среды, зависит от пигмента, вырабатываемого растущими микроорганизмами. Рост бактерий в виде поверхностной пленки характерен для аэрофилов.

Нередко рост микроорганизмов в жидкой питательной среде сопровождается выделением газа, который обнаруживается по появлению пузырьков и пены. Иногда наблюдается появление запаха.

4.9. Рост микроорганизмов на плотных питательных средах

Рост микроорганизмов на плотных средах более разнообразен, чем на жидких. Он может быть сплошным или в виде отдельных колоний, быть обильным, слабым или умеренным. Колонии различаются по величине, форме, контуру края, рельефу, поверхности, цвету, структуре и консистенции. При описании колоний характеризуют все эти признаки.

Форма колонии бывает правильная – круглая или овальная, неправильная – амебовидная или звездчатая, ризоидная – корне-видная, напоминающая переплетающиеся корни деревьев и др.

Размер колонии определяется ее диаметром. В зависимости от диаметра различают мельчайшие или росинчатые, мелкие, точечные и крупноточечные колонии. Мельчайшие или росинчатые колонии можно рассмотреть только под лупой или малым увеличением микроскопа. Точечные имеют диаметр меньше 1 мм, мелкие – 1 мм, средние – 2–4 мм и крупные – 4–6 мм и более.

Поверхность колоний бывает матовая или блестящая с глянцем, сухая или влажная, гладкая или шероховатая. Гладкие колонии обозначают буквой S (smooth), шероховатые – буквой R (rough), что означает соответственно «гладкий» и «шероховатый». Механизм формирования гладких и шероховатых форм колоний обусловлен различием процессов клеточного деления.

Микробные клетки в колониях S-форм располагаются, соприкасаясь своими боковыми поверхностями, клетки R-форм, сохраняя при делении цитоплазматические мостики, образуют цепочки, которые, накладываясь друг на друга, обуславливают шероховатую поверхность и неровный край колонии.

Среди шероховатых форм колоний различают: складчатые, гирозные, по виду напоминающие исчерченную извилинами поверхность мозга, бородавчатые, концентрически или радиально исчерченные, шагреневые (мелкозернистые).

Характер контура края определяют при рассмотрении колонии под лупой или микроскопом с малым увеличением. Различают ровные края в виде четко выраженной линии и неровные. Последние могут иметь следующие признаки:

- фестончатый край, состоящий из крупных, слегка округлых или уплощенных зубцов правильной формы;
- волнистый край, который несколько отличается от фестончатого тем, что крупные зубцы его выражены нечетко;
- эрозированный, или зазубренный, край, состоящий из острых зубцов различной величины и формы;
- бахромчатый край, имеющий нежные ворсинки.

В некоторых случаях четко выраженная линия, ограничи-

вающая колонию от поверхности среды, отсутствует. Такой край колонии называется расплывчатым.

Рельеф колонии характеризуется приподнятостью ее над поверхностью питательной среды и контуром формы в вертикальном разрезе. Рельеф определяют невооруженным глазом или при рассматривании колонии сверху и сбоку через лупу. В зависимости от рельефа различают:

- каплеобразные и куполообразные колонии правильной круглой формы с различно выраженной степенью выпуклости, которые в вертикальном разрезе представляют собой сегмент шара, различающийся длиной радиуса. Слабовыпуклые имеют большую длину радиуса, а куполообразные – меньшую;

- колонии с вдавленным центром;

- плоско-выпуклые колонии с плоским верхом, пологими или круто обрывающимися краями, имеющие в вертикальном разрезе форму трапеции;

- конусообразные колонии, имеющие в вертикальном разрезе форму треугольника;

- колонии с приподнятой в виде соска серединой и валиком по периферии;

- плоские колонии, стелющиеся по поверхности среды.

Цвет колонии определяется пигментом, который продуцируется культурой микроорганизма. Если микроорганизмы пигменты не образуют, их колонии бесцветные или молочно-мутного, похожего на опал цвета.

В проходящем свете такие колонии достаточно прозрачны (прозрачные или полупрозрачные). Пигментообразующие виды, в зависимости от содержащегося в них пигмента, образуют колонии самых различных цветов: кремовые, желтые, золотистые, оранжевые, серовато-синеватые, серые, красные, сиреневые, черные и др. Колонии, имеющие окраску, обычно непрозрачны.

Структура колоний определяется в проходящем свете при слабом увеличении микроскопа, суженной диафрагме или при несколько опущенном конденсоре. У пигментированных колоний и колоний, не пропускающих света, она не определяется. Различают следующие типы структур колоний:

- гиалиновые, без видимой определенной структуры, обычно бесцветные и прозрачные;

- зернистые, в зависимости от величины зерен разделяются на мелко- и грубозернистые;
- нитевидные или волокнистые, характеризующиеся наличием длинных, густо переплетающихся нитей в толще колонии.

Колонии могут быть однородные и неоднородные. У первых строение колонии одинаково во всех ее частях, у вторых отдельные ее части имеют различное строение.

Консистенцию колонии, исследуют посредством прикосновения или взятия из нее части материала бактериальной петлей. По характеру консистенции колонии бывают:

- пастообразные, легко снимающиеся, размазывающиеся и размывающиеся по поверхности питательной среды;
- вязкие или слизистые, прилипающие и тянущиеся за петлей;
- волокнистые или кожистые, плотные, снимающиеся с поверхности питательной среды в виде пленки (обычно всей колонией);
- сухие, рассыпающиеся при прикосновении петли.

4.10. Характер роста по уколу

Характер роста по уколу указывает на отношение микроорганизма к кислороду воздуха: аэробы растут в виде гвоздя, шляпкой вверх, факультативные анаэробы растут равномерно по всему уколу, анаэробы – в нижней части укола. При выращивании на желатине одни бактерии вызывают его разжижение, а другие не разжижают.

4.11. Приготовить мазки и окрасить их по Граму

Из колоний, выросших при выделении чистой культуры, готовят мазки, окрашивают их по Грамму и микроскопируют на максимальном увеличении микроскопа для установления однородности формы микробных клеток. Увиденное в микроскопе, зарисовывают в тетрадь и делают выводы.

5. Вопросы для самоконтроля

1. Как проводится посев микроорганизмов на плотные питательные среды?
2. Как проводится посев микроорганизмов на жидкие питательные среды?
3. Что называется чистой культурой микроорганизмов?
4. Каково назначение чистых культур микроорганизмов?
5. Как выделяются чистые культуры по методу Коха?
6. Как выделяются чистые культуры по методу Дригальского?
7. Какие приемы используются при посевах для предотвращения загрязнения исследуемого материала посторонними микроорганизмами?

Раздел 2. Микрофлора сырья. Факторы, обуславливающие естественную защиту сырья, используемого в пищевой промышленности

В последние десятилетия потребители пищевых продуктов стали уделять пристальное внимание вопросам пищевой безопасности. Именно поэтому, проблемы обеспечения безопасности и качества продукции становятся все более актуальными для предприятий пищевой промышленности. В настоящее время на предприятиях зачастую создаются условия, в которых не всегда возможно обеспечение безусловной безопасности пищи при отсутствии современной системы контроля качества и безопасности продовольственного сырья и готовых видов пищевой продукции. На развитие этой проблемы оказывают влияние множество факторов. К наиболее важным из них относятся:

- новые системы производства, в том числе увеличение массового производства и удлинение пищевых цепей;
- новые вещества, загрязняющие окружающую среду, и изменение экологии и климата;
- новые пищевые продукты, технологии переработки, ингредиенты, добавки и упаковка;

- изменения в состоянии здоровья населения или отдельной группы населения;
- изменение рационов питания и рост спроса на пищевые продукты минимальной переработки;
- изменение способа покупки пищевых продуктов, рост уличного потребления и приема пищи вне дома;
- новые методы анализа, позволяющие обнаруживать опасные факторы, о которых ранее никто не подозревал.

Нововведения в процессах производства и хранения пищи позволяют, с одной стороны, расширить ассортимент пищевой продукции, увеличить сроки хранения и обеспечить удовлетворение требований потребителя, с другой стороны – формируют новые опасные для здоровья человека факторы.

Качество и безопасность пищевой продукции являются необходимыми характеристиками, которые требуют управления и контроля со стороны организации. В пищевой промышленности одним из главных требований потребителя является именно безопасность пищевых продуктов. Использование продуктов питания не должно приводить к пищевым отравлениям, а сами продукты не должны содержать опасные ингредиенты.

Для оценки качества продуктов питания применяют органолептические, физико-химические, микробиологические и биологические методы лабораторного исследования. Лабораторный контроль позволяет получить объективное представление о соответствии продукта государственным общесоюзным стандартам (ГОСТам), республиканским техническим условиям (РТУ) и другим документам, определяющим условия изготовления и качество продукта.

К лабораторным методам исследования качества пищевых продуктов относится и микробиологический анализ. Его важнейшей задачей является определение доброкачественности и санитарного состояния продукта по микробиологическим показателям.

Как известно, нежелательные изменения свойств пищевых продуктов (их порча) при хранении в большинстве случаев обусловлены размножением в них микроорганизмов. Ценность микробиологического анализа заключается в том, что

он позволяет установить начальные стадии порчи внешне доброкачественного продукта по накоплению и изменению состава микрофлоры, определить возбудителя микробной порчи и источники загрязнения.

При производстве пищевых продуктов с использованием микробиологических процессов (кисломолочные продукты, хлебопечение, виноделие) микробиологический анализ используется для контроля технологических показателей продукта: соответствия микрофлоры заданной технологии, развития и накопления производственной микрофлоры и т. д.

Не менее важным является определение в пищевых продуктах возможного содержания условно-патогенных и патогенных микроорганизмов. Микробиологические исследования пищевых продуктов и других объектов внешней среды с целью их санитарно-гигиенической и эпидемиологической оценки как возможных факторов передачи возбудителей заболеваний носят название *санитарно-микробиологических исследований*.

Санитарно-микробиологический контроль осуществляется на всех этапах получения пищевых продуктов и движения их к потребителю (при технологической обработке, хранении, транспортировке и реализации) и является действенной мерой профилактики пищевых заболеваний микробной природы: результаты анализа позволяют установить нарушения санитарного состояния предприятия, оценить эпидемическую значимость продукта и своевременно провести соответствующие предупредительные и оздоровительные мероприятия.

Микробиологический анализ пищевых продуктов осуществляется качественными и количественными методами. Перечень исследований варьирует в зависимости от вида продукта и целей анализа. Основными показателями качества пищевых продуктов являются общее количество микроорганизмов в единице объема (массы) пищевого продукта (микробное число) и содержание санитарно-показательных микроорганизмов. Присутствие патогенных микроорганизмов в продуктах питания не допускаются.

Для ряда пищевых продуктов установлены нормы микробной обсемененности, определяющие пригодность продуктов к

употреблению (ГОСТы, РТУ, санитарные правила и др.). Для многих пищевых продуктов бактериологические нормы не установлены; в отношении некоторых из них опубликованы рекомендации, которые могут быть использованы в практической работе.

Принятые микробиологические показатели качества пищевых продуктов имеют следующее значение как товароведные и санитарные показатели. Общее количество микроорганизмов характеризует степень свежести продукта, стойкость его при хранении, а также эпидемическую значимость, поскольку с увеличением общего микробного загрязнения повышается вероятность содержания в продукте условно-патогенных и патогенных микроорганизмов.

Прямым указанием на эпидемическую опасность пищевых продуктов является обнаружение в них патогенных микроорганизмов и их токсинов. Однако их определение в продуктах питания, как и в других объектах внешней среды, – это трудоемкий и длительный процесс: незначительная концентрация патогенных микробов во внешней среде, эволюционное приспособление к жизнедеятельности в условиях организма требуют сложных методов культивирования указанных микроорганизмов. Так, например, в последние годы большое значение как возбудителям пищевых заболеваний придают энтеропатогенным вирусам. Для их выделения из объектов окружающей среды необходимы сложнейшие методы культивирования (на культурах ткани, в куриных эмбрионах), что, естественно, не могут широко осуществить практические бактериологические лаборатории. Поэтому при массовых анализах пищевых продуктов непосредственное обнаружение патогенной флоры не проводится и осуществляется только по эпидемическим показателям.

О возможном загрязнении пищевых продуктов и других объектов внешней среды патогенными микроорганизмами судят по *косвенным показателям*, в частности по наличию санитарно-показательных микроорганизмов. В качестве санитарно-показательных микроорганизмов используют некоторые виды микробов – сапрофитов, которые содержатся в выделениях че-

ловека и, следовательно, являются возможными спутниками болезнетворных микробов. Так, показателем загрязнения внешней среды испражнениями (фекального загрязнения) являются бактерии группы кишечной палочки, показателем загрязнения выделениями дыхательных путей – гемолитический стрептококк и золотистый стафилококк.

При исследовании пищевых продуктов общепринятым санитарно-микробиологическим тестом является количественное содержание кишечных палочек как показателей фекального загрязнения. Чем больше кишечных палочек в объекте исследования, тем вероятнее присутствие патогенных бактерий кишечнотифозной группы. К бактериям группы кишечных палочек относятся грамотрицательные, подвижные, не образующие спор палочки сбраживающие, как правило, лактозу с образованием кислоты и газа, сбраживающие глюкозу, маннит, мальтозу и в некоторых случаях сахарозу. В природе существует несколько разновидностей кишечных палочек, отличающихся друг от друга некоторыми ферментативными свойствами и имеющих разное санитарное значение. Показателями свежего *фекального загрязнения* принято считать кишечную палочку рода *E. coli* – типичную для кишечной микрофлоры человека и теплокровных животных.

Количественное содержание кишечных палочек в пищевых продуктах определяют титрационным методом и выражают в виде титра кишечной палочки (коли-титра). *Коли-титр* – это наименьшее количество (объем, масса) исследуемого материала, в котором обнаружена кишечная палочка. В ряде случаев (например, при исследовании питьевой воды) результат выражают в виде *коли-индекса*; это число кишечных палочек в единице объема (массы) исследуемого материала.

Для определения коли-титра чаще пользуются так называемым бродильным методом, который основан на способности кишечных палочек расщеплять углеводы с образованием кислоты и газа. Этапы определения коли-титра обычны для титрационного метода: 1) посев различных разведений (или определенной массы) материала на дифференциально-диагностические среды, содержащие один из углеводов и индикатор (чаще среда

Эйкмана или Кесслер); 2) учет бродильного титра, т. е. минимального объема посевного материала, вызвавшего брожение; 3) идентификация кишечных палочек.

Следует отметить, что санитарно-микробиологический анализ некоторых пищевых продуктов включает обязательное исследование на наличие и других условно-патогенных бактерий, наиболее характерных для данного продукта (стафилококков – при исследовании кондитерских кремовых изделий, сальмонелл – при исследовании яичных продуктов и др.).

Микробиологический контроль качества продукции, санитарного состояния предприятий общественного питания и торговой сети осуществляется в плановом порядке и внепланово по эпидемическим показаниям бактериологическими лабораториями

Лабораторная работа № 6. Биохимические свойства микроорганизмов, выделенных в чистую культуру

1. Цель работы

1.1. Изучить биохимические свойства микроорганизмов, выделенных в чистую культуру с целью определения их видовой принадлежности.

2. Задание

Занятие 1.

2.1. Выполнить посев для определения сахаролитических свойств микроорганизмов.

2.2. Выполнить посевы для определения протеолитических свойств микроорганизмов.

2.3. Выполнить посевы для определения редуцирующей способности микроорганизмов.

Занятие 2.

2.4. Просмотреть посевы предыдущего занятия и сделать их описание.

2.5. Сделать вывод о биохимических свойствах изучаемого микроорганизма.

2.6. Приготовить препарат бактерий, окрасить его по Граму и рассмотреть под микроскопом.

2.7 Ознакомиться с правилами пользования определителя бактерий.

3. Теоретическая часть

Для определения видовой принадлежности микроорганизмов – определения вида, рода, семейства, к которому они принадлежат, необходимо установить не только морфологические и культуральные, но и биохимические свойства микроорганизмов.

Морфологические признаки изучаются под микроскопом в препаратах живых и мертвых микроорганизмов. Культуральные признаки микроорганизмов устанавливаются по характеру роста культуры на мясопептонных бульоне, агаре и желатине.

Биохимические свойства у микроорганизмов определяются наличием у них определенного набора ферментов. Одни, из которых расщепляют до различных продуктов сложные органические вещества – белки, жиры и углеводы, а другие вызывают окисление и восстановление различных субстратов.

Биохимические свойства определяют при посеве микроорганизмов на специальные среды, в состав которых входят вещества, воздействия на которые хотят выявить. Например, для определения способности расщеплять углеводы культуру высевают на питательные среды, содержащие различные сахара, а для выявления протеолитических свойств, культуру высевают на питательную среду, содержащую белок.

Изучив основные морфологические, биохимические и культуральные признаки по определителю («ключу») устанавливают видовое название микроорганизма. Для каждой группы микроорганизмов (бактерии, дрожжи, грибы) существуют свои определители, которые составлены с учетом их специфических особенностей.

Изучение биохимических свойств микроорганизмов имеет большое значение в технологических процессах многих пищевых производств (молочном, пивоварении, хлебопечении и др.), а также при определении вида микроорганизмов.

При изучении биохимических свойств микроорганизмов наибольшее практическое значение имеет определение их сахаролитических, протеолитических и редуцирующих свойств. Это связано с тем, что именно эти свойства определяют способность

микроорганизмов расщеплять основные органические вещества (углеводы и белки). Поэтому они, с одной стороны, могут использоваться при производстве различных веществ, а с другой, наносить вред, вызывая порчу как продуктов, так и сырья.

Сахаролитические свойства микроорганизмов определяют путем посева их чистых культур на среды, в состав которых входят различные углеводы (глюкоза, сахароза, мальтоза и др.) и многоатомные спирты (маннит, сорбит и др.).

На расщепление микроорганизмом того или иного сахара или спирта указывает изменение окраски среды. Для этого в состав сред добавляют определенный индикатор (фуксин или лакмус), который изменяет свой цвет при изменении реакции среды (рН среды).

Реакция среды изменяется в том случае, когда входящие в состав среды сахар или спирт под воздействием ферментов микроорганизма подвергается расщеплению с образованием кислоты. При этом может происходить и выделение газа, который часто является конечным продуктом распада сахаров.

Для обнаружения газа перед стерилизацией в пробирку со средой помещают небольшой кусочек поролона или маленькую, запаянную с одного конца стеклянную трубочку («поплавок»). Выделяющиеся пузырьки газа задерживаются поролоном или собираются в верхнем конце трубочки.

Сахаролитические свойства исследуемого микроорганизма изучают, делая его посева на среды ряда Гисса, называемый также «пестрым рядом». В «пестрый ряд» чаще всего входит 5 пробирок с питательными средами, в каждую из которых, добавлен определенный углевод: глюкоза, лактоза, маннит, мальтоза и сахароза.

Иногда при более углубленном изучении биохимических свойств ряд Гисса дополняют питательными средами с дульцитом, сорбитом, ксилозой и некоторыми другими сахарами.

Название «пестрый ряд» обусловлено тем, что под действием ферментов микроорганизма одни углеводы остаются неизменными и, следовательно, цвет питательной среды не меняется, в то время как другие сахара расщепляются, образуя кислые продукты распада, которые изменяют цвет индикатора и соответственно цвет питательной среды.

Среды Гисса бывают жидкими и полужидкими (с добавлением 0,2–0,5% агар-агара). В пробирки с жидкими средами опускают кусочек поролона или «поплавок». В полужидких средах газообразование определяют по наличию мелких пузырьков газа в толще среды и стойкой пены на ее поверхности.

Протеолитические свойства микроорганизмов определяют, делая их посевы на среды, содержащие белки, в основном, путем посева в мясопептонный бульон, желатин и молоко. В зависимости от вида микроорганизмов будут происходить отличающиеся друг от друга изменения этих питательных сред.

Под воздействием протеолитических ферментов, выделяемых микроорганизмами в окружающую среду, происходит распад белков. В результате последовательно образуются все более простые вещества: белки → пептоны → пептиды → аминокислоты. Образовавшиеся аминокислоты поступают внутрь бактериальной клетки.

Дальнейший распад аминокислот в клетке происходит по-разному в зависимости от вида микроорганизма. Поэтому конечные продукты распада у разных микроорганизмов будут различаться: у одних это будет аммиак, у других сероводород, у третьих индол и т. д.

Для обнаружения продуктов распада аминокислот производят посев изучаемого микроорганизма на мясопептонный бульон или пептонную воду. В течение нескольких дней посевы инкубируют и затем выявляют образовавшиеся вещества с помощью соответствующих реактивов.

Посев в желатин делают уколом в столбик. Полученные посевы выдерживают несколько дней при комнатной температуре не выше 25°C (при температуре выше 25–27°C желатин плавится). При разложении микроорганизмом желатина по уколу происходит его разжижение. При этом в зависимости от вида микроорганизма форма разжижения желатина будет различна.

Редуцирующие (окислительно-восстановительные) свойства микроорганизмов определяются их способностью отщеплять от того или иного субстрата водород (под воздействием соответствующих дегидрогеназ).

При этом окисление одного вещества (донора) всегда со-

проводится восстановлением (редукцией) какого-нибудь другого вещества (акцептора). Акцептором водорода у микроорганизмов могут выступать разные вещества: кислород воздуха, органические и минеральные соединения.

Для выявления дегидрогеназ и определения их активности в питательную среду добавляют различные красители, которые могут присоединять водород, т.е. являются его акцепторами. При этом краситель восстанавливается и изменяет свой цвет, превращаясь в бесцветное соединение. В качестве акцептора водорода используют метиленовый синий, лакмусовое молоко, малахитовый зеленый, индигокармин, нейтральный красный и др. Один и тот же вид микроорганизмов ведет себя неодинаково по отношению к разным красителям. Это используется в качестве дополнительного дифференциального признака.

4. Практическая часть

Занятие 1.

4.1. Выполнить посевы для определения сахаролитических свойств микроорганизмов

В пять пробирок со средами малого ряда Гиса: с сахарозой, глюкозой, мальтозой, лактозой и маннитом, провести посев микроорганизмов, выделенных в чистую культуру. Посев проводят иглой, стараясь не затронуть кусочек поролона или поплавка, лежащий на дне пробирки. Полученные посевы инкубируют 48 часов при температуре 37°C.

Если микроорганизмы обладают ферментами, которые могут разлагать те или иные углеводы, цвет соответствующей среды изменится. Если разложение углеводов идет с газообразованием, губка всплывает.

4.2. Выполнить посевы для определения протеолитических свойств микроорганизмов

4.2.1. Посев на желатин

Сделайте посев микроорганизмов, выделенных в чистую культуру, на мясопептонный желатин. Посев производят уколом, погружая иглу с исследуемой культурой вглубь питатель-

ной среды до дна пробирки. При определении психрофилов пробирки оставляют при комнатной температуре (20–22°C), закрыв их темной, не пропускающей свет бумагой или тканью.

При определении мезофилов посеvy ставят в термостат и инкубируют при температуре 37°C. В термостат помещают и 1–2 контрольные пробирки с незасаженным желатином. Наблюдение за изменением среды ведется в течение 20 суток.

Посевы и контрольные пробирки ежедневно просматривают. При температуре 37°C желатин плавится, поэтому пробирки, вынутые из термостата, опускают в холодную воду.

В пробирках, где разжижение желатина произошло в результате действия фермента микроорганизма, среда и в холодной воде останется жидкой. Если разжижение произошло под воздействием температуры, в холодной воде среда загустеет.

Пробирки, в которых среда после суточного термостатирования не изменилась, как и контрольные, снова ставят в термостат. Просматривают их ежедневно в течение 20 дней, до тех пор, пока среда не изменится. Если по прошествии 20 дней изменений не произошло, указывают, что данный микроорганизм желатин не разлагает.

4.2.2. Посев на молочный агар Эйкмана

Посев делают петлей или шпателем на поверхность молочного агара, разлитого в чашки Петри, так, чтобы получить изолированные колонии.

Полученные посеvy инкубируют при температуре 37°C в течении 24–48 часов. При наличии у микроорганизма протеолитического фермента, расщепляющего белок молока казеин, вокруг колоний такого микроорганизма образуются прозрачные зоны, хорошо видимые на общем молочно-мутном фоне среды.

4.2.3. Выявление конечных продуктов расщепления белков

Некоторые виды микроорганизмов с хорошо выраженной протеолитической активностью могут расщеплять белки и пептоны до продуктов глубокого распада: сероводорода, аммиака или индола.

Определение сероводорода. Сероводород является конечным продуктом расщепления серосодержащих аминокислот: цистеина, цистина и метионина. Для его определения исследуемую культуру петлей засевают в пробирку с мясопептонным бульоном. Сразу же после посева между стенкой пробирки и пробкой помещают полоску фильтровальной бумаги, пропитанную 10%-ным раствором уксуснокислого свинца.

Посевы инкубируют 7–10 дней при температуре 37°C. Если под воздействием ферментов засеянной культуры образуется сероводород, он взаимодействует с ацетатом свинца с образованием сульфида свинца, который придает индикаторной бумаге черно-бурое окрашивание (бумага чернеет).

Определение индола. Индол образуется при расщеплении гетероциклической аминокислоты триптофана. Для его выявления исследуемую культуру петлей засевают на среду Строгова или другую среду, рекомендуемую для обнаружения индола. Сразу же после посева между стенкой пробирки и пробкой помещают полоску фильтровальной бумаги, пропитанную раствором щавелевой кислоты так, чтобы индикаторная бумага не касалась питательной среды.

Посевы инкубируют 24–48 ч при температуре 37°C. Образование индола определяют по окрашиванию нижнего конца индикаторной бумаги в бледно-розовый цвет, хорошо заметный в проходящем свете.

Определение аммиака. Для определения аммиака проводят посев исследуемой культуры на мясопептонный бульон или пептонную воду. Сразу же после посева между стенкой пробирки и пробкой помещают полоску лакмусовой бумаги.

Посевы инкубируют 7–10 дней при температуре 37°C.

При выделении аммиака розовая лакмусовая бумажка приобретает синюю окраску.

4.3. Выполнить посевы для определения редуцирующей способности микроорганизмов

Посев на молоко с мителеновым синим. В 5 мл среды засевают петлю исследуемой культуры, если посев ведется с плотной питательной среды, или при помощи пипетки 0,1 мл бульонной культуры. Посевы инкубируют 24–48 ч при тем-

пературе 37°C.

Если микроорганизм обладает хорошо выраженной редуцирующей способностью на метиленовый синий, среда изменит цвет – с голубой станет кремовой. Если редуцирующая способность выражена слабо – среда приобретает зеленоватое окрашивание.

Посев на лакмусовое молоко. Пробирки с лакмусовым молоком засевают так же, как с молоком с метиленовым синим. Посевы термостатируют при температуре 37°C в течение 10 дней, ежедневно наблюдая за изменением цвета среды. При наличии редуцирующей способности розовато-сиреневый цвет среды обесцвечивается.

Занятие 2.

4.4. Описание посевов

Просмотрите посевы предыдущего занятия и сделайте их описание. Посевы на жидких питательных средах надо рассматривать осторожно, чтобы не перемешать их содержимое. При описании посевов на ряде Гисса, необходимо указать все наблюдаемые изменения и их интенсивность: характер роста по уколу, изменение цвета среды, помутнение, газообразование и т. д.

При описании протеолитических свойств указывается, разжижает или нет данный микроорганизм желатин (и если да, то на какой день), расщепляет или нет казеин, образуются ли при разложении белков газообразные продукты: индол, аммиак или сероводород.

При описании посевов на желатине, отметить характер и форму его разжижения: одни бактерии разжижают его в виде воронки, другие послойно, третьи – мешковидно.

По росту бактерий в столбике МПА или РПА определяют их отношение к кислороду. Аэробы растут на поверхности среды – гвоздем вверх, строгие анаэробы – в глубине среды, гвоздем вниз, факультативные анаэробы – равномерно по всей длине укола.

Отмечают наличие или отсутствие у исследуемого микроорганизма редуцирующей способности.

На основании полученных данных делают вывод о биохи-

мических свойствах изучаемого микроорганизма.

4.5. Приготовить препарат и окрасить его по Граму

Из одного или двух полученных посевов делают мазок, фиксируют его и окрашивают по Граму.

Полученный препарат микроскопируют на максимальном увеличении микроскопа (увеличение объектива 90х или 100х) и делают вывод о морфологических признаках изучаемого микроорганизма. Увиденное в микроскопе нужно зарисовать в тетради.

4.6. Ознакомление с правилами определения вида микроорганизмов

Определить вид изучаемого микроорганизма можно только по всему комплексу присущих ему признаков: морфологических (форма и размеры клетки, способность к движению и спорообразованию); тинкториальных (окраска по Граму); культуральных (характер роста на мясопептонных бульоне, агаре и желатине); физиологических (особенность питания и дыхания, характер, выделяемых при этом продуктов, отношение к температуре – минимальная, оптимальная и максимальная); биохимических (способность к сбраживанию различных углеводов, характер протеолитической активности, редуцирующая способность).

После всестороннего изучения и описания свойств исследуемого микроорганизма по определителям («Определитель бактерий» А. Бердже или «Определитель бактерий и актиномицетов» Н.А. Красильникова») идентифицируют вид изучаемого микроорганизма, сопоставляя выявленные морфологические, тинкториальные, культуральные, физиологические и биохимические свойства со свойствами, характерными для различных видов, приведенных в определителях.

5. Вопросы для самоконтроля

1. Чем могут различаться колонии различных видов бактерий?
2. Как устанавливается чистота культуры бактерий?
3. Какие морфологические признаки используются для определения бактерий?

4. Какие биохимические признаки используются при определении видового названия бактерий?
5. Каким образом можно установить тип дыхания бактерий?
6. Как выявляется у бактерий способность к разложению белковых веществ?
7. Как определить способность бактерий к сбраживанию сахаров?
8. Что такое редуцирующая способность микроорганизма и как ее определить?
9. Что необходимо знать, чтобы определить вид микроорганизма?
10. Какие среды используются для изучения у микроорганизмов сахаролитических и протеолитических свойств и редуцирующей способности?

Лабораторная работа 7. Микробиологическое исследование муки на наличие картофельной палочки

1. Цель работы

1.1. Изучить особенности микробиологического исследования муки на наличие картофельной палочки.

2. Задание

2.1. Выполнить посев разведений суспензии муки на МПА.

2.2. Провести определение обсемененности муки картофельной палочкой.

2.3 Оформить отчет и сделать выводы.

3. Теоретическая часть

Картофельная палочка (*Bacillus mesentericus*) в ассоциации с сенной палочкой является возбудителем наиболее распространенной микробной порчи хлебобулочных изделий – тягучей порчи, или картофельной болезни. Это спорообразующая аэробная палочка, сапрофит. Оптимальной температурой ее развития

является – 30–45°C.

Споры палочки характеризуются высокой термоустойчивостью, благодаря которой они сохраняются в хлебе во время выпечки, и в благоприятных условиях (при медленном остывании хлеба) прорастают, вызывая гнилостные процессы – гидролиз белков хлеба. Анализ муки на степень обсемененности картофельной палочкой проводят в плановом порядке на мельничных предприятиях, а также на хлебозаводах – при отсутствии в сертификатах на муку соответствующих указаний или при поступлении в производство недоброкачественной муки. Исследованию подвергают также выборочные партии готовых хлебобулочных изделий.

4. Практическая часть

Занятие 1.

4.1. Посев разведений суспензии муки на МПА

Внести в колбу с 50 мл стерильной водопроводной воды (разведение 1:10) 5 г муки и взбалтывать в течение 5 мин для получения равномерной суспензии.

Прогреть полученную суспензию на водяной бане при температуре 95°C в течение 10 мин.

Приготовить разведение прогретой суспензии 1:100 (1 мл ее внести в 9 мл стерильной водопроводной воды).

Произвести посев разведенной муки:

а) 2 стерильные чашки Петри надписать со стороны дна, указав на каждой чашке одно из разведений (1:10, 1:100);

б) по 1 мл каждого разведения внести пипеткой на дно соответствующей чашки и залить теплым 38 МПА.

После уплотнения агара поставить чашки в термостат при температуре 25°C.

Занятие 2.

4.2. Определение обсемененности муки картофельной па-

лочкой

Необходимо учесть результаты посева; подсчитать число выросших колоний и, зная разведение исходного материала, определить количество спор в 1 г муки.

Оценка результатов. Оценить качество муки: при обнаружении в 1 г муки до 200 спор ее качество считается нормальным, от 200 до 1000 – сомнительным, при содержании 1000 и более спор мука непригодна для употребления.

5. Вопросы для самоконтроля

1. Какими микроорганизмами представлена микрофлора свежемолотой муки?
2. Что необходимо предусматривать при подготовке зерна к помолу?
3. За счет чего возможно обеспечить максимальное снижение общего количества микроорганизмов, переходящих в муку из зерна?
4. Охарактеризуйте понятие «кондиционирование» зерна.
5. В какой зависимости находится процент выхода муки от количества бактерий и грибов, переходящих в муку в процессе помола зерна?

Лабораторная работа 8. Санитарно-микробиологический анализ кулинарных изделий

1. Цель работы

1.1. Исследование микрофлоры кулинарных изделий

2. Задание

2.1. Выполнить определение микробного числа винегрета и салата из вареных овощей.

2.2. Выполнить определение микробного числа изделия из рубленого мяса – шницеля жареного.

2.3. Оформить отчет и сделать выводы.

3. Теоретическая часть

В промышленности и на предприятиях общественного питания из различного пищевого сырья изготавливают в широком ассортименте кулинарные изделия. Одни из них – полуфабрикаты – изделия, полностью подготовленные к термической обработке; другие – кулинарно готовые – употребляют в пищу лишь после разогревания или даже без него.

Качество, состав микрофлоры готовой продукции зависят от качества и микробной обсемененности перерабатываемого сырья и вспомогательных компонентов (входящих в рецептуру блюд), от режима термической обработки, санитарного состояния используемого оборудования, инвентаря, упаковочного материала, а также от условий (продолжительности и температуры) содержания готовых изделий с момента выработки до реализации.

В технологии производства кулинарных изделий некоторые подготовительные операции, например, разделка сырья, измельчение, порционирование, и особенно панирование (сухарями, жидким тестом и др.) перед обжариванием, увеличивают обсемененность перерабатываемого сырья. Термическая обработка (варка, жарка, запекание) значительно (на 2–3 порядка) снижает число микроорганизмов в изделии, однако, чем больше их было в сырой- изделии, тем обильнее будет и его остаточная микрофлора. Последующие операции – охлаждение, укладка в тару и упаковка готовых изделий – обычно приводят к повышению их обсемененности микроорганизмами (ввиду инфицирования извне, возможно и размножение остаточной микрофлоры.) Поэтому очень важно сразу после кулинарной обработки быстро охладить продукт.

Вторичное инфицирование продуктов, прошедших тепловую обработку, особенно при наличии ручных операций, представляет опасность, так как продукт может быть инфицирован микробами, небезопасными для здоровья людей. Поэтому необходимо строго соблюдать установленные режимы и санитарно-

гигиенические требования на всех стадиях изготовления, хранения и реализации кулинарных изделий.

Готовые изделия из рубленого мяса требуют строгой санитарной оценки, поскольку измельчение мяса, а также введение по рецептуре различных дополнительных компонентов способствуют накоплению в продукте различной микрофлоры.

Бактериологическое исследование этих продуктов проводится в плановом порядке для контроля санитарного состояния производства, условий хранения и реализации в торговой сети, а также по эпидемическим показаниям. Бактериологическими показателями качества являются: 1) общее количество бактерий в 1 г продукта; 2) присутствие бактерий группы кишечных палочек; 3) присутствие бактерий рода сальмонелл и протей, а в колбасных изделиях – также и споровых анаэробов.

4. Практическая часть

Занятие 1.

4.1. Определение микробного числа винегрета и салата из вареных овощей.

Принципы оценки результатов санитарно-бактериологического контроля:

- критерием высокого качества санитарной обработки оборудования, посуды, инвентаря и др. служит отсутствие на поверхности обработанных предметов санитарно-показательных, а также патогенных микроорганизмов;

- обнаружение значительной микробной обсемененности готовых продуктов сапрофитной микрофлорой должно расцениваться как показатель санитарного неблагополучия объекта;

- выявление высокой обсемененности готовых продуктов санитарно-показательными микроорганизмами следует расценивать как указание на возможность заражения этих продуктов патогенными микроорганизмами;

- обнаружение патогенных микроорганизмов в готовых выпускаемых или реализуемых продуктах (в определенных коли-

чествах продукта) расценивается как показатель эпидемического неблагополучия объекта;

- результаты санитарно-бактериологических исследований следует сравнивать с показателями стандартов или рекомендаций по допустимому уровню обсемененности продуктов микроорганизмами

При обследовании процесса приготовления салата или винегрета бактериологическому исследованию подвергаются все исходные компоненты, входящие в состав блюда, по этапам их обработки: вареные овощи - после их охлаждения и очистки, далее - после измельчения; вареное мясо - после охлаждения, после измельчения; исследуется также зеленый горошек и др. компоненты блюда. Затем берут пробу блюда после перемешивания всех компонентов, но без заправки и квашеных овощей. Заправку исследуют отдельно. Одновременно производятся смывы с инвентаря и оборудования, разделочных досок, ножей, крышки стола, овощерезок, посуды, рук работников холодного цеха.

4.1.1 Отбор проб

Для отбора проб продуктов и блюд в лаборатории заготавливаются стерильные банки, закрытые двумя слоями бумаги и обвязанные бечевкой, стерильные ложки, стерильные пинцеты и ножи, завернутые в бумагу.

Пробы продуктов рекомендуется отбирать вдвоем с привлечением в качестве помощника представителя обследуемого учреждения. Помощник в одной руке держит банку, другой - по мере необходимости открывает крышку. В это время лицо, отбирающее пробу, разворачивает требующуюся ложку или пинцет, берет материал и переносит в банку. При необходимости отбора пробы от большого куска отрезают часть его с помощью стерильного ножа и пинцета.

Если проба блюда берется в раздаточной, то в банку переносят с тарелки всю порцию; если образец отбирают на производстве от большой массы продукта (из кастрюли, от большого куска мяса), то берут пробу весом около 200 г, жидкие блюда -

после тщательного перемешивания; плотные - из разных мест в глубине куска. Напитки минеральные, безалкогольные, слабоалкогольные и пиво отбирают в количестве 1 бутылки заводской упаковки и 200 мл напитка, изготовленного на предприятии.

4.1.2 Подготовка проб к исследованию

Навеску плотных продуктов растирают в стерильной фарфоровой ступке с песком или гомогенизируют в микроразмельчителе тканей с постепенным добавлением 135 мл 0,1% раствора пептона в воде или изотонического раствора хлорида натрия и оставляют при комнатной температуре на 15 минут. Затем для посевов взвесь отбирают стерильной пипеткой с широким концом. Принимается, что 1 мл приготовленной взвеси содержит 0,1 г исходного продукта.

4.1.3 Приготовление разведений для посева

При исследовании в качестве первого разведения используют 10-% взвесь, полученную после механической обработки продукта в ступке или гомогенизаторе.

4.1.4 Проведение посева

Из каждой пробы делают посев глубинным методом на 2 параллельные чашки Петри из 2-3 последовательных разведений в количестве 1,0 мл, используя для этого 2-% агар, приготовленный из сухого питательного агара. Контролировать температуру надежнее и проще, если агар разливают небольшими порциями в пробирки (12-15 мл). Агар в пробирках быстрее расплавляется и охлаждается более равномерно до нужной температуры. Чашки заливают расплавленным и остуженным до 45 °С агаром сразу же после внесения материала. В противном случае может наблюдаться неравномерное распределение колоний в виде отдельных скоплений в толще агара; для более равномерного распределения посевного материала, кроме того, содержимое чашки перемешивают вращательными движениями.

После застывания агара чашки с посевами помещают в термостат дном вверх, инкубируют при 30 °С в течение 72 часов; при необходимости предварительный учет производят через 48 часов.

4.1.5 Подсчет колоний

Количество колоний подсчитывается на каждой из засеянных чашек. Счет колоний на чашках производят с помощью прибора для счета колоний бактерий или лупы. Для лучшей видимости считают колонии на темном фоне (под чашку кладут темную бумагу), чашки помещают дном кверху. Каждую колонию отмечают на дне чашки чернилами или тушью.

При подсчете придерживаются следующих правил:

а) если на чашке выросло небольшое количество колоний, например 100, подсчитывают все колонии;

б) если колонии распределены равномерно и их количество измеряется несколькими сотнями (200 - 300 колоний), допускается подсчет колоний не менее чем на 1/3 площади чашки. В этих случаях дно чашки делят карандашом на 6 секторов и считают колонии в 3 секторах. Затем делают пересчет на всю площадь чашки: вычисляют среднее количество колоний на площади одного сектора и полученное количество колоний на одном секторе умножают на 6;

в) если на чашке вырастает более 300 колоний, они распределены равномерно и не представляется возможным повторить анализ, то, применяя прибор для счета колоний бактерий, подсчитывают 10 полей зрения площадью по 1 см² в разных местах чашки. Полученные числа складывают и выводят среднее арифметическое.

Чтобы высчитать количество колоний на всей чашке, полученное среднее число умножают на площадь чашки (πR). Обычно диаметр чашки равен 8,5–10 см; $\pi = 3,14$.

При отсутствии прибора для счета колоний бактерий можно использовать обычную миллиметровую бумагу, в которой вырезают «окошко» площадью 1 см². Подсчет колоний производят с лупой.

Пример. Если среднее число колоний на 1 см^2 составляет 18, диаметр чашки 10 см, то число колоний на всей площади чашки $18 \times 78,5 = 1413$, округляя в ответе, указывают 1400.

Число колоний, выросших на чашке, должно отражать количество жизнеспособных микроорганизмов, содержащихся в засеянном объеме исследуемого материала. Поскольку последний, как правило, засевают в разведенном виде, число выросших на чашке колоний умножают на степень взятого разведения, рассчитывают среднее арифметическое и устанавливают количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов в 1 г (мл) продукта.

При установлении количества мезофильных бактерий не все чашки могут быть использованы для вычисления среднего арифметического:

а) нельзя использовать посеvy для вычисления среднего арифметического, если количество выросших колоний на чашках менее 30. В этом случае в протокол исследований вносят показатели обсемененности, полученные при подсчете колоний только по одной или двум чашкам, число колоний на которых больше 30. В случае роста колоний на засеянных чашках в количестве менее 30 в результатах анализа рекомендуется следующая формулировка: "Рост единичных колоний при посеве (указать количество засеянного продукта)";

б) не используются посеvy для вычисления среднего арифметического показателя на тех чашках, на поверхности которых более чем на $1/2$ площади отмечается ползучий рост спорообразующих микроорганизмов, последние могут маскировать рост прочих бактерий. Возможны случаи, когда на чашках из всех разведений получен рост споровых микроорганизмов и подсчет изолированных колоний практически не возможен. В этих случаях в протоколе исследования следует указывать: «Рост спорообразующих микроорганизмов».

Пример расчета. Если на чашках Петри при посеве 0,1 г продукта выросло в среднем 135 колоний, а при посеве 2-го разведения (0,01 г продукта) - 9 колоний, то в результатах исследования учитывают цифровые данные, полученные при посеве 1-

го разведения, т.е. количество микроорганизмов $135 \times 10 = 1350$ в 1 г продукта.

Для получения более точных данных по количеству мезофильных бактерий целесообразно сопоставлять результаты подсчета колоний, полученные на чашках с посевами материала из последовательных разведений. Числа подсчитанных колоний должны примерно соответствовать кратности взятых разведений. Если количество колоний на чашках с посевами из последующих разведений (1:10, 1:100) почти совпадает или мало между собой разнится, то это указывает на недостаточное перемешивание посевного материала при приготовлении разведений и перед посевом.

4.1.6 Сравнить полученные результаты с санитарными требованиями к данному виду продукта

Занятие 2.

4.2 Определение микробного числа изделия из рубленого мяса – шницеля жареного выполняется по аналогичному плану в соответствии с пунктом 4.1.

5. Вопросы для самоконтроля

1. Как подразделяются пищевые продукты по физическим свойствам?

2. Перечислите факторы, влияющие на формирование микрофлоры пищевых продуктов?

3. Санитарно-гигиеническое значение микробиологического показателя – «общее микробное число»?

4. Как подготавливают навеску плотных продуктов?

5. Перечислите принципы оценки результатов санитарно-бактериологического контроля.

Лабораторная работа 9. Микробиологический анализ консервов из растительного сырья

1. Цель работы

1.1. Провести микробиологическое исследование консервов

2. Задачи

2.1. Просмотр демонстрации – подготовка банки консервов к бактериологическому анализу.

2.2. Выявление аэробной мезофильной микрофлоры.

2.3. Выявление анаэробной мезофильной микрофлоры.

3. Теоретическая часть

На поверхности плодов и овощей постоянно находятся различные микроорганизмы, значительная часть которых не принимает участия в процессах заболеваний и порчи и находится в неактивном состоянии. Эти микроорганизмы представляют эпифитную микрофлору плодов и овощей. Видовой состав и численность микроорганизмов зависит от вида растения, географических, климатических и других условий.

В течение длительного времени свежие плоды и овощи остаются жизнеспособными, в них протекают различные физиологические процессы (дыхание, сохранена функция транспирации - предохранение от испарения воды). Повреждения, возникшие при уборке, перевозке и хранении создают возможность сапрофитным микроорганизмам проникать в растительные клетки и размножаться. Кроме того, в результате дыхания растительного сырья может произойти самонагрев, который повышает вероятность микробной порчи. В результате порчи плодов и овощей различают следующие биохимические процессы: гниение, разложение пектиновых веществ, клетчатки.

Содержание микроорганизмов в готовом продукте определяется, в основном, микроорганизмами, внесенными с сырьем, а также положительным или отрицательным влиянием технологического процесса.

Вторичное инфицирование продуктов, особенно прошедших тепловую обработку, представляет опасность, так как продукт может быть инфицирован микроорганизмами, опасными для здоровья людей. Поэтому необходимо строго соблюдать установленные режимы и санитарно-гигиенические требования на всех стадиях переработки растительного сырья.

В соответствии с требованиями нормативно-технической документации для выработки доброкачественных, микробиологически стабильных консервов на предприятиях консервной промышленности принимаются меры, которые предотвращают инфицирование перерабатываемого сырья. С этой целью проводят микробиологический контроль продуктов, подготовленных к стерилизации. Проверка бактериологической обсемененности содержимого консервных банок перед стерилизацией включает два определения: общей бактериальной обсемененности и спор мезофильных анаэробов.

Определение общей бактериальной обсемененности проводят ежедневно каждую смену на каждой линии и по каждому виду вырабатываемых консервов. Для анализа отбирают три пробы образца через 1 час после начала работы линии. Предельно допустимое значение общей бактериальной обсемененности колеблется в широком диапазоне и зависит от вида консервов

В консервном производстве достигнуть полной стерильности консервов не удается по ряду причин, главной из которых является снижение пищевой ценности и ухудшение органолептических показателей готовой продукции при длительной термической обработке. Поэтому при консервировании стерилизация должна обеспечивать промышленную стерильность продукта.

В консервированном продукте промышленной стерильности должны отсутствовать микроорганизмы, способные развиваться при температуре хранения, установленной для данного вида (партии) консервов. Промышленно стерильные консервы не содержат микроорганизмы и вещества микробного происхождения, опасные для здоровья потребителя.

4. Практическая часть

4.1. Просмотр демонстраций.

Необходимо ознакомиться с методикой подготовки банки с консервированным продуктом для исследования. в протоколе отметить: а) банки, предназначенные для анализа, предвари-

тельно выдерживают в термостате при температуре 37°C в течение 5 суток (при исследовании на наличие термофильных бактерий банки выдерживают в термостате двое суток при 55°C, перед вскрытием проверяют герметичность банки).

С этой целью банку нагревают в кипящей воде 5–7 мин; появление пузырьков газа в каком-либо месте поверхности банки указывает на нарушение герметичности. Такая банка не подлежит бактериологическому анализу; вскрывают консервы с соблюдением строгих правил стерильности: перед вскрытием банку встряхивают и протирают тщательно спиртом; верхнюю крышку обжигают в пламени газовой горелки, затем обожженным пробойником производят вскрытие в центре крышки, отверстие расширяют до 1–1,5 см в диаметре и накрывают стерильной половинкой чашки Петри.

4.2. Бактериологический анализ на наличие мезофильных аэробных и анаэробных бактерий.

Занятие 1.

Стерильной пипеткой отобрать из банки жидкую массу с плотными частицами и произвести посев на питательные среды: для выявления мезофильных аэробных бактерий 1 г продукта перенести в пробирку с МПБ; для выявления мезофильных анаэробных бактерий 5 г продукта внести на дно пробирки с 10 мл расплавленного и охлажденного до 60–70°C МПА; после застывания агара к столбику долить 2–3 мл расплавленного и охлажденного агара и оставить пробирку в вертикальном положении; термостатирование проводят при температуре 37°C на 24–48 ч.

Занятие 2.

Учет результатов посева.

1. Из сред с признаками роста сделать мазок для микроскопии и окрасить по Граму.

2. Отметить в протоколе ход анализа, наличие или отсутствие микрофлоры и ее морфологию. На этом исследование в учебных целях заканчивается. В протоколе следует записать, что в практике бактериологических лабораторий исследование

продолжается при обнаружении микроорганизмов, подозрительных на патогенную или условно-патогенную флору.

Так, при обнаружении грамотрицательных бесспоровых палочек производят посев на среду Эндо или Левина для идентификации бактерий кишечной группы; при обнаружении стафилококков – на среды, идентифицирующие патогенные штаммы; обнаружение анаэробных палочек с субтерминальной спорой (у конца палочки) требует идентификации с возбудителем ботулизма.

5. Вопросы для самоконтроля

1. Охарактеризуйте понятие «стерилизация консервов».
2. Как называются консервированные продукты, в которых возможно развитие остаточной микрофлоры, но способные ограниченное время храниться без порчи?
3. От чего зависит термоустойчивость микроорганизмов?
4. Какие виды порчи плодов и овощей Вам известны и какие микроорганизмы их вызывают?
5. Что такое фитопатогенные микроорганизмы?

Основные свойства бактерий, наиболее часто встречающихся в пищевых продуктах

На продуктах питания встречаются различные виды микроорганизмов, которые могут вызвать порчу продуктов и явиться причиной пищевых отравлений. Наиболее значимы в этом отношении представители семейства Micrococcaceae и родов Pseudomonas, Proteus, Escherichiae, Bacillus, Clostridium и Salmonella.

Из семейства Micrococcales наиболее часто обнаруживаются бактерии родов Micrococcus, Streptococcus, Staphylococcus, Sarcinae. Большинство кокков имеет форму шара. Они относятся к аэробам или факультативным анаэробам, обладают устойчивостью к соли и сахару, чаще грамположительные, реже грамотрицательные. Развиваются в температурных границах от 0 до 50°C. Микрококки выдерживают нагревание до 65°C в течение 30 мин.

Бактерии рода Streptococcus

Молочно-кислые стрептококки (в частности, *Streptococcus lactis*) имеют округлую форму и располагаются в виде цепочек. Хорошо растут в присутствии углеводов, свертывают молоко. Ароматизирующий стрептококк *Streptococcus diacetylactis* вызывает свертывание молока и выделяет в среду ароматические вещества диацетил, ацетальдегид. Оптимальная температура развития 25–30°C.

St. diacetylactis обладает способностью сбрасывать соли лимонной кислоты. Поэтому для его культивирования необходимо делать пересев на агар, содержащий лимонно-кислый кальций. При росте на такой среде, вокруг колоний *St. diacetylactis* образуется зона просветления.

Эти два вида стрептококков участвуют в процессе созревания сыров, пресервов, выделяя молочную, уксусную и пропионовую кислоты, которые снижают pH, что губительно действует на гнилостные микроорганизмы и благоприятно сказывается на действии протеолитических ферментов, вызывающих гидролиз белков.

Молочно-кислые стрептококки отличаются требовательностью к питательным веществам и поэтому обычно не встречаются в почве и водоемах. В естественных условиях они присутствуют в основном в молоке, в местах его переработки и молочных продуктах (*Streptococcus lactis*, *Streptococcus diacetylactis* и др.), на растениях и разлагающихся растительных остатках, в кишечнике и на слизистых оболочках человека и животных (*Streptococcus faecalis* и др.).

Энтерококки (*Streptococcus faecalis* и др.) являются молочно-кислыми стрептококками кишечного происхождения.

Энтерококки образуют короткие цепочки. Они устойчивы к действию хлорида натрия, изменению реакции среды, выдерживают низкие температуры и нагревание до 70°C в течение 30 мин. Расщепляют углеводы, гидролизуют белки, обладают гемолитической активностью.

Streptococcus faecalis – факультативный анаэроб, растет при содержании в среде до 6,5% хлорида натрия, при температурах от 10 до 45°C. Выдерживает нагревание до 60–65°C в течение 30 мин, погибает при температуре до 80–85°C. Устойчив к высушиванию, замораживанию, действию кислой реакции среды.

Обитает в кишечнике человека и животных, может служить санитарно-гигиеническим показателем воды и продуктов. Развивается на пищевых продуктах и, попадая с ними в организм человека, является возбудителем пищевых токсикоинфекций.

Бактерии рода *Staphilococcus*

Бактерии рода *Staphilococcus* широко распространены в природе. Среди них есть как сапрофитные, так и патогенные формы. Это аэробные или факультативно-анаэробные, грамположительные кокки, диаметром 0,8–1 мкм. Неподвижные, располагаются гроздьями, спор и капсул не образуют.

При росте на мясном или рыбном бульоне сначала (в первые сутки) вызывают помутнение среды, затем образуется осадок, а на 2–3-и сутки – пристеночное кольцо и пленка. Хорошо растут на средах с добавлением соли. Образуют разные пигменты: белые, золотистые, лимонно-желтые. Вырабатывают ферменты характерные для патогенных видов (лецитиназа, коагулаза и др.). Разжижают желатин, свертывают молоко, при разложении белка выделяют аммиак.

Представители этого рода способны вырабатывать экзо- и эндотоксины, обладающие устойчивостью к действию температуры.

Staphilococcus aureus (золотистый стафилококк) представляет собой грамположительные, факультативно-анаэробные кокки растущих после деления в виде грозди винограда, с оптимальной температурой развития 30–37°C. Хорошо размножается и при комнатной температуре (18–20°C) При температуре ниже

4–5°C обычно не развивается. Образует колонии золотистого цвета, т.к. содержит пигмент – липохром, имеющий такой цвет.

Золотистый стафилококк устойчив к высушиванию, высоким концентрациям соли – развивается при ее 8–15% концентрации. При pH ниже 4,5 его рост и развитие приостанавливается. В замороженных продуктах длительно сохраняет свою жизнеспособность. Нагревание при 70°C выдерживает более часа, при 80°C погибает в течение 20–40 мин.

Обладают протеолитической и сахаролитической активностью, поэтому хорошо развивается на субстратах, богатых как углеводами, так и белками. Обладает способностью коагулировать плазму крови, за что получил название коагулазоположительный.

Развиваясь на пищевых продуктах золотистый стафилококк выделяет особый экзотоксин – энтеротоксин А, к которому человек очень чувствителен. Энтеротоксин обладает высокой термостабильностью – не разрушается при кипячении в течение 90 мин. Его полное разрушение происходит при температуре 100°C в течение 2 часов, а при 120°C в течение 30 мин.

Пищевые отравления возникают при употреблении различных продуктов: молочных, мясных, рыбных, кондитерских изделий с кремом и др. Пищевые продукты, обсемененные золотистым стафилококком, обычно не изменяют свои органолептические свойства, т. е. не имеют внешних признаков порчи.

У человека, золотистый стафилококк находится, в основном, на коже и слизистой носоглотки. Кроме энтеротоксина он может вырабатывать и другие токсины и вызывать различные заболевания (ангину, гнойничковые заболевания и др.)

Источником инфицирования пищи стафилококком являются в основном лица, страдающие гнойничковыми заболеваниями кожи или те, у которых токсигенный стафилококк присутствует в носоглотке.

Бактерии рода *Pseudomonas*

Большинство бактерий принадлежащих к роду *Pseudomonas* холодоустойчивы с минимальной температурой роста от –2 до –5°C и оптимумом около 20°C. Многие из них помимо протеоли-

тической активности обладают липолитической и сахаролитической активностью.

Бактерии рода *Pseudomonas* это аэробные, грамотрицательные, не образующие спор подвижные палочки с полярными жгутиками. Большинство этих микроорганизмов являются психрофилами и растут при температуре $-2...-5^{\circ}\text{C}$, с оптимумом $+20^{\circ}\text{C}$. Колонии круглые, неправильной формы, плоские и выпуклые, слизистые, пастообразные, бесцветные и пигментированные.

Характерной особенностью этих бактерий является образование сине-зеленого или желтого пигмента.

Бактерии рода *Pseudomonas* обладают высокой протеолитической и липолитической активностью, что приводит к глубокому расщеплению как белков, так и липидов. Способны также сбраживать углеводы с образованием кислот и выделять слизь.

Их биохимическая активность снижается при добавлении NaCl (при его концентрации 5–6% и выше) и при подкислении среды (при pH ниже 5,5).

Представители этого рода широко распространены в природе. Некоторые виды являются возбудителями болезней (бактериозов) культурных растений, плодов и овощей.

Pseudomonas putrificens – грамотрицательная, факультативно-анаэробная, подвижная палочка, с одним полярным жгутиком. Обладает протеолитической и липолитической активностью, образует сероводород, разжижает желатин, быстро восстанавливает лакмусовое молоко, не сбраживает маннит, восстанавливает окись триметиламина в триметиламин. Растет при 0°C , поэтому вызывает порчу охлажденных продуктов.

Бактерии рода *Proteus*

Бактерии рода *Proteus* представляют собой факультативно-анаэробные полиморфные палочки, имеющие длину до 3 мкм, подвижные, грамотрицательные, не образующие спор. Они устойчивы к низким температурам, переносят замораживание и оттаивание. При температуре 60°C погибают через час, а в 1%-ом растворе фенола и формалина через 30 мин.

При росте на МПА (РПА) отмечается ползущий рост – «роение» бактерий. На средах Эндо и Плоскирева образуют округлые прозрачные колонии с характерным запахом. Под колониями цвет среды изменяется на желтый, на среде с молоком

вокруг колоний образуется зона просветления.

Обладают протеолитической активностью, разжижают желатин, в бульоне дают муть, свертывают молоко, сбраживают глюкозу и мальтозу до кислоты и газа.

Бактерии рода *Proteus* вызывают гнилостную порчу продуктов питания. Они относятся к условно-патогенным микроорганизмам и при высокой обсемененности продукта (10^6 КОЕ/г) могут вызвать пищевые отравления.

Proteus vulgaris – мелкие грамотрицательные, бесспорные, очень подвижные палочки, которые в зависимости от условий легко изменяют свою форму и размеры. Оптимальная температура их развития 25–37°C, при температуре ниже 5°C прекращают свое развитие, но сохраняют свою жизнеспособность и в замороженных продуктах. Протей устойчив к высоким концентрациям соли – развивается при ее 10–12% концентрации

При росте на МПА (РПА) растут с образованием сплошной пленки. Разлагают углеводы с образованием кислот и газов. Гнилостные свойства резко выражены: при разложении белков образуется сероводород, аммиак и индол. Их образование обуславливает сильный неприятный гнилостный запах.

Протей широко распространен в природе: в почве, воде, пищевых продуктах. Является представителем нормальной микрофлоры кишечника человека. Относится к условно-патогенным микроорганизмам, но некоторые представители обладают патогенными свойствами (участвуют в воспалительных процессах), некоторые из них вырабатывают энтеротоксины.

Пища, в которой активно размножается протей, может вызвать пищевое отравление – токсикоинфекцию. Ее причиной могут являться продукты, на которых он чаще всего размножается. Это продукты из мяса и рыбы (особенно фаршевые изделия), а также измельченные салаты, винегреты, овощные гарниры.

Содержание большого количества протей в пищевых продуктах (так же как и кишечной палочки) указывает на санитарное неблагополучие того предприятия, на котором эти продукты изготавливались.

Бактерии рода *Escherichiae*

Бактерии рода *Escherichiae* – короткие полиморфные, под-

вижные и неподвижные, грамотрейцательные палочки длиной 1–3 мкм. Спор и капсул не образуют, не разжижают желатин, свертывают молоко, расщепляют пептоны и белки до аммиака и сероводорода. Хорошо расщепляют углеводы (лактозу, глюкозу, сахарозу) до кислоты и газа.

На мясном или рыбном бульоне образуют муть и пристеночное кольцо. При росте на РПА образуют прозрачные колонии, на среде Эндо – плоские красные колонии средней величины, которые могут иметь металлический блеск (*Escherichiae coli*), термолабильные, неустойчивы к действию химических соединений.

Бактерии рода *Escherichiae* (группы кишечной палочки) являются основными санитарно-показательными микроорганизмами, показателями фекального загрязнения. Они обитают в кишечнике человека и животных, являясь представителями нормальной микрофлоры. Некоторые штаммы *E. coli* при определенных условиях могут вызывать различные воспалительные процессы (перитонит, цистит и др.), т.е. являются условно-патогенными.

Наряду с условно-патогенными штаммами *E. coli* существуют энтеротоксигенные формы, вызывающие у людей острые кишечные заболевания (гастроэнтериты, колиэнтериты), а также пищевые токсикоинфекции.

Источниками заражения пищевых продуктов бактериями группы кишечной палочки являются больные (или бациллоносители) люди и теплокровные животные. Кишечная палочка может быть занесена на продукты руками, не вымытыми после туалета, после работы с сырыми продуктами, особенно овощами (огороды нередко удобряют не обезвреженными нечистотами).

Escherichiae coli (кишечная палочка) – это подвижные, грамотрейцательные, бесспорные факультативно-анаэробные палочки, форма и размеры которых могут сильно изменяться в зависимости от условий. Сбраживают глюкозу с образованием кислот и газа, большинство штаммов сбраживают и лактозу.

Оптимальная температура ее развития 37°C, но растет и при комнатной температуре и при 40–45°C. Кишечная палочка термолабильна: при 60°C погибает в течение 15–20 мин, а при 75°C через 4–5 мин. Минимальная температура ее роста

5–10°C, но некоторые холодоустойчивые штаммы, способные развиваться при температуре около 0°C.

E. coli обычный обитатель кишечника человека и его присутствие в питьевой воде или на продуктах само по себе не очень опасно. Однако в кишечнике могут присутствовать и ряд патогенных бактерий, которые вместе с *E. coli* выделяются в окружающую среду и могут попасть в воду и пищевые продукты.

Для того, чтобы не применять длительных, специальных методов выделения каждого вида патогенных бактерий, пользуются общим индикатором загрязнения, которым является кишечная палочка. Обнаружение этого вида на продуктах показывает, что они загрязнены бактериями, которые содержатся в кишечнике, среди которых могут быть и патогенные.

Бактерии рода *Bacillus*

Bacillus megatherium – спорообразующие подвижные грамположительные крупные палочки размером до 10 мкм, с закругленными концами, аэробы, сапрофиты. На РПА образуют гладкие, матовые, блестящие, белые или кремовые колонии, выпуклые или слегка приподнятые, края очерчены или слегка волнистые.

При росте на средах с желатином разжижают его с образованием пленки, гидролизуют крахмал, в бульонных культурах дают помутнение и пленку. Пептонизируют молоко, разлагают глюкозу без образования газа до кислоты.

Обладают протеолитической активностью, расщепляют белки с образованием аммиака и сероводорода. Индола не образуют. Хорошо растут при температурах 22–45°C.

Bacillus subtilis (*сенная палочка*) – мезофильные, аэробные, спорообразующие, подвижные, грамположительные палочки, длиной до 5 мкм, располагаются по одной или цепочками. Разжижают желатин. При росте на агаре образуют гладкие, блестящие, слабо пигментированные колонии.

Обладают высокой протеолитической активностью. Разлагают белки с образованием аммиака и сероводорода, пептонизируют молоко. Разлагают углеводы до кислоты и газа. Развиваются в широком диапазоне pH 3,8–8,0.

Bac. mesentericus (*картофельная палочка*) – мезофильные,

аэробные, спорообразующие, подвижные, грамположительные, короткие, толстые палочки, длиной до 4 мкм. Часто располагаются цепочками. Разжижают желатин с образованием пленки, свертывают и пептонизируют молоко. Разлагают глюкозу до кислоты без газа, обладают протеолитической активностью, разлагая белки с выделением сероводорода и аммиака.

Споры сенной и картофельной палочки отличаются высокой термоустойчивостью. Температурный оптимум развития этих бактерий 35–45°C, максимальная температура развития 50–55°C; минимальная 5°C.

Помимо разложения белков, эти бактерии способны разлагать пектиновые вещества, полисахариды растительных тканей, сбраживать углеводы. Сенная и картофельная палочки широко распространены в природе и являются возбудителями порчи многих пищевых продуктов.

Bacillus cereus – крупные, грамположительные, мезофильные, аэробные, спорообразующие палочки. Оптимальная температура их развития 30–32°C, минимальная 5–10°C. Являются осмофилами. Могут расти при 10–15%-ной концентрации хлорида натрия и 30–60% концентрации сахара.

При pH ниже 4,0 не развиваются. Споры обладают высокой термоустойчивостью и могут сохраняться в продуктах не только при обычной тепловой обработке, но и при стерилизации консервов.

Бацилла цериус широко распространена в природе: в почве, воде, растениях. Ее развитие в пищевых продуктах (при обсемененности более 10^5 – 10^6 КОЕ/г) может вызвать пищевое отравление (токсикоинфекцию).

Бактерии рода *Clostridium*

Clostridium putrificum – подвижные, спорообразующие палочки, облигатные анаэробы, с оптимальной температурой развития 37–43°C и минимальной 5°C. Образуют достаточно крупные термоустойчивые споры, которые располагаются ближе к концу клетки, которая поэтому приобретает вид барабанной палочки.

Обладают высокой протеолитической активностью, разлагают белки с образованием большого количества газов – сероводорода и аммиака. Углеводы эти бактерии не разлагают. При

росте в средах для анаэробов образуют муть и газ.

Clostridium sporogenes – подвижные, спорообразующие палочки, облигатные анаэробы, с оптимальной температурой развития 35–40°C и минимальной 5°C. Образуют термоустойчивые споры, которые в клетке расположены ближе к ее концу. Особенностью спорообразования является то, что споры образуются очень быстро (в течение первых суток роста).

Обладают протеолитической, липолитической и сахаралитической активностью. Углеводы разлагают до кислот и газа, липиды – с образованием свободных жирных кислот, белки – с образованием большого количества сероводорода.

В связи с быстрым образованием термоустойчивых спор являются тест-культурой при разработке режимов стерилизации баночных консервов.

Оба эти вида клостридий (*Cl. putrificum* и *Cl. sporogenes*) являются возбудителями порчи баночных консервов. Они могут сохраняться при стерилизации, входить в состав остаточной микрофлоры консервов и вызвать их бомбажную порчу.

Clostridium perfringens – факультативно-анаэробные, неподвижные, грамположительные, окруженные капсулой крупные палочки, размером 4,0–8,0 мкм. Оптимальная температура их развития 37–43°C, но хорошо растут и при 46–48°C. При температуре 20–22°C размножаются медленно. Повышение концентрации соли до 7–10% замедляет их развитие, при pH ниже 4 они не развиваются. Обладают протеолитической и сахаралитической активностью. Образуют крупные споры, располагающиеся центрально или субтерминально. Споры термоустойчивы – выдерживают кипячение в течение 30–60 мин, а у термоустойчивых штаммов даже до 2–6 часов.

При обычной кулинарной обработке споры сохраняются, выдерживают стерилизацию, поэтому могут входить в состав остаточной микрофлоры и вызвать бомбажную порчу консервов с томатной заливкой, желе и др. При pH 5,6 и выше накапливаются летальные токсины.

Продукт, в котором содержится большое количество данного микроорганизма, опасен для человека, т.к. попадая в организм вызывает пищевую токсикоинфекцию. Известно шесть типов *Clostridium perfringens* (A, B, C, D, E, F), различающихся по

составу образуемых ими токсинов. Основная роль в возникновении пищевых токсикоинфекций принадлежит типу А.

Clostridium botulinum (ботулинус) представляет собой крупную, подвижную, спорообразующую палочку. Облигатный анаэроб, с оптимальной температурой развития 30–37°C. При температуре ниже 4–5°C обычно не развивается. Спорозная бактерия имеет вид барабанных палочек, т.к. споры располагаются в основном на одном из концов клетки и их диаметр больше диаметра клетки.

Обладает протеолитической активностью, пептонизирует молоко, сбраживает некоторые углеводы с образованием кислот и газа. При рН ниже 4,2 не развивается. Повышение концентрации соли более 5–6% задерживает его развитие, при концентрации выше 10% приостанавливается образование токсина.

Вегетативные клетки погибают при температуре 80°C через 30 мин. Споры очень термоустойчивы, они выдерживают нагревание при 100°C в течение 3–6 ч, при 105°C до 2 ч, при 120°C до 25 мин. Устойчивы к действию низких температур, поэтому в замороженных продуктах споры могут длительно сохранять жизнеспособность (в течение нескольких месяцев).

Cl. botulinum обладают способностью образовывать экзотоксины. Ботулинический экзотоксин один из наиболее сильных ядов. Он очень устойчив – не разрушается под действием соляной кислоты, замораживании, мариновании, посоле и копчении. Выдерживает кипячение до 10–15 мин.

Токсины могут сохраняться в пищевых продуктах после тепловой обработки и при хранении, и, попадая с пищей в организм человека, вызывать пищевые отравления (токсикозы).

Причиной отравления могут быть самые разные продукты: консервы (мясные, рыбные, овощные, грибные), особенно домашнего приготовления, вяленые и копченые мясные и рыбные продукты с низкой концентрацией соли.

Особенностью развития данного микроорганизма в продукте является то, что оно может не сопровождаться изменением органолептических свойств продукта.

Ботулинус широко распространен в природе: в почве, в водоемах, в кишечнике человека, животных и рыб, встречается на фруктах и овощах. Попадая на пищевые продукты, в благоприят-

ных для него условиях размножается и выделяет токсин.

Бактерии рода *Salmonella*

Некоторые бактерии относящиеся к роду *Salmonella* вызывают пищевые токсикоинфекции, которые называют сальмонеллезами. Среди пищевых бактериальных отравлений они занимают первое место. Наиболее часто возбудителем сальмонеллеза является *Salmonella typhimurium*.

Salmonella typhimurium (бреславльская палочка) – это короткие (до 4 мкм), подвижные, грамотрицательные, не образующие спор палочки, являющиеся факультативными анаэробами. Они обладают протеолитической и сахаролитической активностью. Сбраживают глюкозу, мальтозу и маннит с образованием кислоты и газа. Лактозу и сахарозу не расщепляют.

Оптимальная температура их развития около 37°C, хотя они хорошо растут и при температуре 18–20°C. Выдерживают нагревание в 60°C около часа, в 75°C – не более 5–10 мин. При температуре ниже 4–5°C не развиваются. Длительно сохраняют жизнеспособность при низких температурах. При температурах от –10 до –20°C не погибают в течение нескольких месяцев.

Увеличение концентрации хлорида натрия до 6–8% тормозит их развитие, а при 10–12% оно прекращается. Но даже при высоких концентрациях NaCl сальмонеллы длительно сохраняют свою жизнеспособность. Оптимум pH для них 7,2–7,4. В кислой среде (pH ниже 5,0) их развитие приостанавливается.

Экзотоксина сальмонеллы не образуют, заболевание возникает тогда, когда в организм человека попадает большое количество размножающихся микроорганизмов, после гибели которых выделяется содержащийся в их клетках эндотоксин, который характеризуется высокой токсичностью.

Сальмонеллы распространены у животных, особенно у крупного рогатого скота, водоплавающей домашней птицы и грызунов. Мясо и мясопродукты чаще, чем другие пищевые продукты, могут служить причиной отравления, поэтому сальмонеллезы ранее называли мясными отравлениями. Заражение мяса сальмонеллами может происходить как при жизни животного, так и при разделке туш, транспортировке

и хранении.

Сальмонеллами нередко бывает обсеменено мясо птицы, особенно водоплавающей, а также утиные и гусиные яйца. Поэтому эти яйца не подлежат продаже в розничной торговле и их нельзя использовать для приготовления майонеза, кулинарных и кондитерских изделий.

Причиной сальмонеллезов могут явиться и другие продукты: молочные, ливерные и кровяные колбасы, рыбные и молочные продукты, куриные яйца, кремы и др.

Сальмонеллы могут появиться в продукте в результате вторичного загрязнения – через загрязненные руки, посуду, оборудование. Переносить и инфицировать сальмонеллами продукты могут мыши, мухи и др.

Размножение сальмонелл в пищевых продуктах не приводит к заметным изменениям их органолептических свойств; внешний вид, вкус и запах продукта не изменяются. Обнаружить возбудителя можно только микробиологическими методами анализа.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Основная литература

Емцев В.Т. Микробиология: учебник / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М.: Юрайт, 2014. – 445 с.

Введение в технологии продуктов питания: учеб. пособие / под ред. А.П. Нечаева. — М.: ДеЛи плюс, 2013. — 720 с.

Дополнительная литература

1. Антипова Л.В. Технология и оборудование производства колбас и полуфабрикатов : учеб. пособие / Л.В. Антипова, И.Н. Толпыгина, А.А. Калачев. – СПб.: Гиорд, 2011. – 600 с.

2. Антипова Л.В. Технология и оборудование птицеперерабатывающего производства : учеб. пособие / Л.В. Антипова, С.В. Полянских, А.А. Калачев. – СПб.: Гиорд, 2009. – 512 с.

3. Вербина Н.М. Гидромикробиология с основами общей микробиологии. – М.: Пищевая промышленность, 1980. – 288 с.

4. Востроилов А.В. Основы переработки молока и экспертиза качества молочных продуктов: учеб. пособие / А.В. Востроилов, И.Н. Семенова, К.К. Полянский. – СПб.: Гиорд, 2010. – 512 с.

5. ГОСТы Консервы. Инструкция по проведению санитарно-микробиологического контроля на рыбоперерабатывающих предприятиях. – Л.: Гипрорыбфлот, 1992.

6. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. – М.: Академия, 2003. – 464 с.

7. Долганова Н.В., Першина Е.В., Хасанова З.К. Микробиология рыбы и рыбных продуктов. – М.: Мир, 2005. – 224 с.

8. Дутова Е.Н., Гольфшрам М.М., Призренова И.И., Сазонова А.С. Техническая микробиология рыбных продуктов. – М.: Пищевая промышленность, 1976. – 270 с.

9. Мудрцова-Висс К.А. Микробиология. – М., Экономика. 1984. – 240 с.

10. Мудрцова-Висс К.А., Кудряшова А.А., Дедюхина В.П. Микробиология, санитария и гигиена. – М.: Деловая литература, 2001. – 388 с.

11. Перетрухина А.Г., Белокапытова Е.Е, Лабораторный практикум по санитарно-микро-биологическому контролю на рыбоперерабаты-вающих предприятиях. – Мурманск: МВИМУ, 1987. – 151 с.

12. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Санитарные правила и нормы. СанПиН 2.1.4.1074-01.

13. Шлегель Г. Общая микробиология. – М.: Мир, 1982. – 422 с.

Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет»

Микробиологический контроль пищевых производств [Электронный ресурс]. — URL: <http://www.twirpx.com/files/food/quality/mcontrol/>

Микробиология пищевых продуктов [Электронный ресурс]. — URL: <http://biobib.ru/index.php/mikrobiologiya/obshaya-mikrobiologiya/mikrobiologiya-pishevix-produktov.html>

Официальный сайт издательства «Пищевая промышленность» [Электронный ресурс]. — URL: www.foodprom.ru.