	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный аграрный университет»	Приложение к ОПОП ВО
		Методические указания

Кафедра инфекционных болезней,
зоогигиены и ветсанэкспертизы

Б1.0.25 МИКРОБИОЛОГИЯ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

к лабораторным работам и практическим занятиям

Направление подготовки

35.03.07 Технология производства и переработки
сельскохозяйственной продукции

Профили подготовки

Прогрессивные технологии производства и переработки продукции животноводства

Квалификация (степень) выпускника
бакалавр

Уфа 2024

Методические указания обсуждены и одобрены на заседании кафедры инфекционных болезней, зоогигиены и ветсанэкспертизы 21 марта 2024 г, протокол № 8.

Составитель:

Ильясова Зулейха Закуановна – кандидат биологических наук, доцент кафедры инфекционных болезней, зоогигиены и ветсанэкспертизы ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ

Ответственный за выпуск:

Заведующий кафедрой инфекционных болезней, зоогигиены и ветсанэкспертизы кандидат биологических наук, доцент Николаева О.Н.

г.Уфа, ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ,
кафедра инфекционных болезней, зоогигиены и ветсанэкспертизы

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Лабораторная работа № 1 Техника безопасности при работе в микробиологической лаборатории. Устройство светового микроскопа. Морфология микроорганизмов	5
Лабораторная работа № 2 Бактериальные краски. Простой способ окрашивания. Порядок приготовления препарата	15
Лабораторная работа № 3 Сложные способы окрашивания. Окраска по Граму	18
Лабораторная работа № 4 Окраска спор и капсул. Исследование микроорганизмов на подвижность	21
Лабораторная работа № 5 Питательные среды для культивирования микроорганизмов. Техника культивирования.	25
Лабораторная работа № 6 Культуральные свойства микроорганизмов	32
Лабораторная работа № 7 Рубежный контроль	35
Лабораторная работа № 8 Морфология плесневых грибов и дрожжей	37
Лабораторная работа № 9 Методы стерилизации	41
Лабораторная работа № 10 Методы микробиологического исследования воды и воздуха	47
Лабораторная работа № 11 Методы микробиологического исследования молока	49
Практическое занятие № 1 Методы микробиологического исследования мяса	53
Практическое занятие № 2 Методы микробиологического исследования яиц	61
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	67
Приложение А	68

ВВЕДЕНИЕ

Целями освоения дисциплины Микробиология являются формирование у студентов знаний и представлений о многообразии микробного мира, его глобальную роль в жизни планеты, в практической деятельности человека, показать значение биотехнологии и экологии микроорганизмов, их роль в превращении биогенных веществ в природе, об основах теоретических знаний, о биологии и экологии микроорганизмов (прокариот), методов работы с ними, методов контроля за состоянием пищевых продуктов и различных предметов обихода.

Задачами изучения дисциплины являются:

- изучение принципов таксономии, морфологии и физиологии микроорганизмов, их роли в круговороте биогенных веществ, влияние факторов внешней среды на развитие микроорганизмов;

- изучение экологии микроорганизмов (микрофлоры почвы, воды, воздуха, животного организма);

- изучение вопросов генетики и систематики микроорганизмов и учения об инфекции и иммунитете;

- изучение микробиологии кормов, молока, мяса, яиц, кожевенно-мехового сырья; изучение методов микробиологического исследования;

- ознакомление с возбудителями пищевых токсикоинфекций и токсикозов, передающихся человеку через мясные и молочные продукты, кожевенно-меховое сырье.

- действия на них факторов внешней среды;

- принципов промышленного культивирования микроорганизмов.

В результате освоения ОПОП ВО бакалавриата обучающийся должен овладеть следующими результатами обучения по дисциплине:

ОПК-1 Способен решать типовые задачи профессиональной деятельности на основе знаний основных законов математических, естественнонаучных и общепрофессиональных дисциплин с применением информационно - коммуникационных технологий

Освоение студентами указанной программы обеспечивает фундаментальные знания в области общей и специальной микробиологии и дает возможность направленно регулировать микрофлору с целью повышения качества кормов, молока, молочных продуктов, мяса, яиц, сохранности продуктов питания, профилактики и лечения болезней животных.

Лабораторная работа №1

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ. УСТРОЙСТВО СВЕТОВОГО МИКРОСКОПА. МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

1 Цель работы: Ознакомиться с работой микробиологической лаборатории; изучить технику безопасности при работе в микробиологической лаборатории; изучить основные части светового микроскопа и принципы работы с ним; ознакомиться с основными формами микроорганизмов.

2 Материалы и оборудование. Журнал по технике безопасности, световые микроскопы, плакаты с шаровидными, палочковидными и извитыми формами микроорганизмов.

3 Общие сведения. Основная задача бактериологических лабораторий - диагностика болезней сельскохозяйственных животных (включая птиц), пушных зверей, рыб, пчел, а также проведение экспертизы молока, мяса и других пищевых продуктов и кормов.

В учебных учреждениях микробиологической лабораторией является учебная аудитория, максимально оборудованная всем необходимым для практической работы студентов. Также имеются подсобные помещения. Микробиологическая лаборатория позволяет студентам овладеть методами микробиологических, серологических и других исследований.

В студенческой лаборатории столы должны быть оснащены лампами дневного света для работы с микроскопами. Рабочие столы должны быть покрыты толстым стеклом, пластиком или плексигласом (органическое стекло) с целью их обработки. Посередине стола устанавливают колбу с водой, сливную чашку и мостик. По краям размещают штативы для пробирок, бактериологических петель, шпателей, колодку с красками, спиртовки, банку с притертой пробкой со спиртовыми ватными тампонами, банки для чистых и отработанных предметных стекол с дезинфицирующим раствором.

Подсобные помещения должны быть оборудованы раковиной, электрической плитой, столами с металлической поверхностью или облицованы плиткой, вытяжным, сушильным и другими шкафами. Для обеспечения работы должны быть холодильник, термостат, автоклав и отдельно бокс-комната. Пол учебной лаборатории и подсобных помещений покрывают линолеумом, стены облицовывают плиткой или окрашивают белой масляной краской.

Районную лабораторию размещают в отдельном здании, вдали от проезжих дорог. В ней предусматривают приемное отделение, бактериологический, вирусологический, биохимический, серологический и патологоанатомический отделы; выделяют специальные помещения для термостатов, стерилизации посуды и питательных сред, для мытья посуды. Для выполнения работы в асептических условиях оборудуют специальные изолированные помещения – боксы. Лабораторных животных размещают в виварии. Кроме того, имеются комнаты для специалистов, обслуживающего персонала, кабинет заведующего, помещения для библиотеки, склада, весовой, раздевалки и др.

В моечной должны быть столы, раковины, электрические или газовые плиты, сушильный, вытяжной и другие шкафы. Пол и стены желательно облицевать плиткой.

В стерилизационной комнате могут быть 1 или 2 паровых стерилизатора (автоклав) и стол. Стерилизационная комната должна хорошо вентилироваться. Пар из стерилизатора до подъема давления выводят через резиновую трубку во внешнюю среду или направляют в ведро с водой. Дверь (без стекла) и окна должны открываться наружу.

Средоварочная комната служит для приготовления питательных сред. Стены ее должны быть облицованы плиткой, или покрашены масляной краской, пол выстлан плиткой или покрыт линолеумом. В средоварочной необходимы газовая или электрическая плита, электроплитки, ящики с отсеками для сред в пробирках, столы, шкафы для хранения компонентов сред, мясной воды и некоторых сред в колбах, холодильник.

В термостатной могут находиться термостаты разных форм и размеров. Для выращивания плесневых грибов температура в термостате обычно составляет 20-35°C, для большинства сапрофитов – 25-30°C, для возбудителей инфекционных болезней – 35-37°C, термофилов – 40-45°C и т. д.

Бокс-комната используется для посевов и пересевов культур микроорганизмов и проведения научно-исследовательской работы в стерильных условиях. Бокс должен быть застеклен, и иметь предбоксник (тамбур) с раздвижной дверью. Стекла должны быть хорошо промазаны, чтобы не проникал воздух, а вместе с ним и микроорганизмы, стены облицованы плиткой или окрашены белой масляной краской, пол покрыть линолеумом. Уборку в боксе производят влажным способом с применением дезинфицирующих средств (2-3 % раствором натрия гидрокарбоната – пищевой соды, 3-5% раствором фенола и т.д.). Воздух стерилизуют бактерицидными лампами (БУВ-15, БУВ-30 и др.). В зависимости от степени загрязненности воздуха стерилизацию осуществляют от 30 мин до нескольких часов. Находиться в комнате с включенной бактерицидной лампой нельзя, так как ультрафиолетовые лучи вызывают острое воспаление роговицы глаз. Для предупреждения поражения необходимо пользоваться защитными очками.

В виварии содержат белых мышей, белых крыс, морских свинок, кроликов и других лабораторных животных.

4 Порядок выполнения работы. Ознакомиться с техникой безопасности при работе в микробиологической лаборатории и изучить основные формы микроорганизмов.

5 Задание

5.1 Расписаться в журнале по технике безопасности после ознакомления с основными требованиями микробиологической лаборатории;

5.2 Ознакомиться с устройством светового микроскопа. Освоить механическую и оптическую часть микроскопа;

5.3 Изучить шаровидные, палочковидные и извитые формы микроорганизмов.

Техника безопасности при работе в микробиологической лаборатории. На первом занятии студенты знакомятся с техникой безопасности при работе в микробиологической лаборатории и расписываются в журнале по технике

безопасности. Студенты при работе в микробиологической лаборатории должны соблюдать следующие правила:

1. В лабораторию входить строго в белом халате и шапочке (косынке). Халат должен быть наглухо застегнут, волосы подобраны под шапочку.
2. Строго запрещено вносить верхнюю одежду, посторонние предметы и продукты питания.
3. В помещении лаборатории категорически запрещается пить, курить, принимать пищу.
4. Строго запрещено выносить из лаборатории какие-либо предметы (пробирки, чашки, колбы и т.п.).
5. Перед началом работы обязательно проверяют наличие и исправность приборов, посуды, спиртовки и пр. О замеченных недостатках и неисправностях сообщают преподавателю или лаборанту.
6. Аппаратуру и электроприборы включать с разрешения преподавателя или обслуживающего персонала.
7. Нельзя касаться металлическими и другими предметами проводов и контактных частей электросети.
8. За каждым студентом закрепляется свое рабочее место.
9. Каждый студент обязан соблюдать чистоту и порядок на рабочем месте.
10. На столе не должно быть посторонних предметов.
11. Категорически запрещается зажигать одну спиртовку от другой во избежание пожара, использовать только спички.
12. Соблюдать правила обращения с химическими и другими реактивами.
13. При работе с жидким инфицированным материалом используют резиновые груши, соединенные с пипеткой.
14. Материал, используемый для учебных занятий, должен рассматриваться как особо опасный.
15. При распаковке исследуемого материала необходимо соблюдать осторожность - банки с материалом снаружи обтирают ватой, смоченной дезинфицирующим раствором и ставят только на подносы или кюветы.
16. Вскрытие трупов лабораторных животных производят в специальной одежде, на соответственном оборудованном столе с помощью необходимых инструментов, используя для этих целей кювету. Инструменты после вскрытия помещают в стакан с дезраствором или обжигают над пламенем спиртовки, на стол класть запрещается!
17. Жидкости, содержащие патогенных микробов, переливают над сосудом с дезраствором.
18. Если патологический материал попал случайно на стол, его немедленно удаляют тампоном, смоченным дезинфицирующим раствором. При попадании зараженного материала на кожу, конъюнктиву, слизистую ротовой полости принимают экстренные меры к обеззараживанию.
19. По окончании работы патологический материал, использованные культуры микроорганизмов, инструменты и поверхность стола обеззараживают. В конце занятия бактериальные культуры и другой материал студенты сдают преподавателю.

20. Перед уходом из лаборатории необходимо привести рабочее место в порядок, снять халат, вымыть руки и обработать их спиртом.

Выполнение правил работы и технику безопасности на учебных занятиях по микробиологии контролируют дежурные студенты.

Устройство светового микроскопа. Микроскоп (греч. micros – малый; scireo – смотрю, вижу) – это специальный оптический прибор для увеличения исследуемых объектов, невидимых невооруженным глазом. В микробиологической практике с помощью микроскопа определяют морфологию, строение, рост и развитие микроорганизмов.

Микроскоп состоит из двух основных частей – механической и оптической (рисунок 1).

Механическая часть включает:

а) основание (подошва или башмак, рисунок 1 - 1) - обычно цельнометаллический с подковообразной или прямоугольной ножкой, что обеспечивает устойчивость микроскопа;

б) штатив (тубусодержатель, рисунок 1 - 10);

в) тубус - может быть наклонным или прямым. В его верхнюю часть вставляется окуляр (рисунок 1 - 9);

г) предметный столик (рисунок 1 - 5) - по форме он может быть круглый или прямоугольный. Для фиксации предметных стекол на его поверхности имеются зажимы или держатель препарата (рисунок 1 - 13). По сторонам предметного столика расположены центровочные винты, при помощи которых он перемещается в разных направлениях.

д) револьвер (револьверная головка, рисунок 1 - 7) - нижняя пластина вращается и имеет гнезда для ввинчивания объективов, верхняя закреплена неподвижно.

е) систему винтов:

- макровинт (рисунок 1 - 14) – служит для грубой наводки, полный оборот которого поднимает или опускает тубусодержатель на 0,1 мм. Механизм макрометрической фокусировки состоит из системы зубчатых колес и рычага. Во избежание поломок обращаться с ним нужно осторожно. Не рекомендуется вращать его до упора;

- микровинт (рисунок 1 - 15) – служит для точной настройки, на барабане микрометрического винта нанесено 50 делений, каждое из которых соответствует перемещению системы на 2мкм. Микровинт может располагаться на макровинте, рядом с макровинтом или на основании микроскопа;

- винт конденсора (рисунок 1 - 16) – служит для осветления или затемнения поля зрения микроскопа.

Оптическая часть включает:

а) объективы (рисунок 1 - 6) - самая важная и наиболее ценная часть микроскопа. Они представляют систему линз, закрепленных в металлической оправе, число которых доходит до 10. Передняя (фронтальная) линза – самая малая, она производит основное увеличение, остальные (коррекционные) исправляют недостатки оптического изображения.

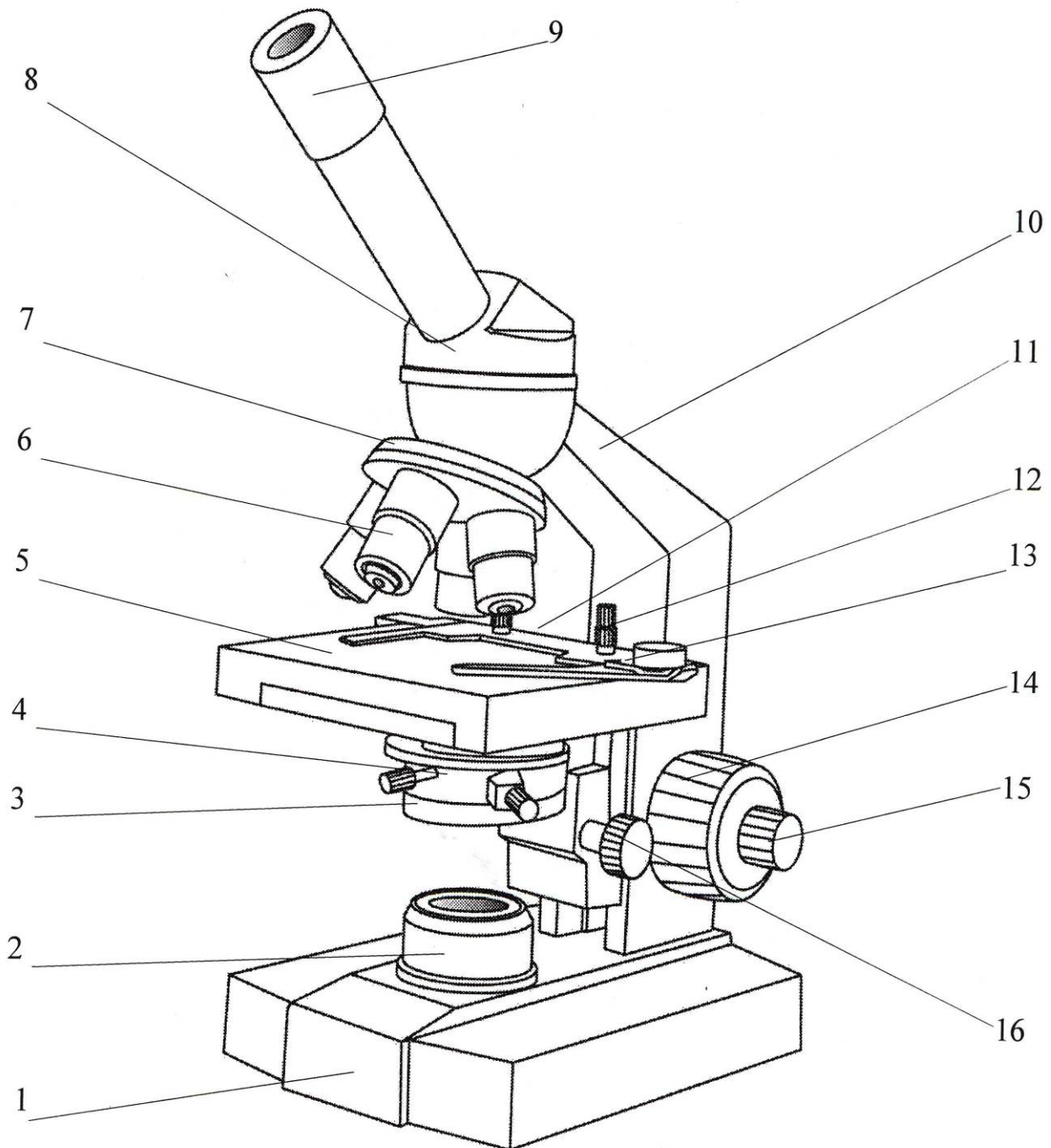


Рисунок 1 Устройство светового микроскопа БИОМЕД-2

1 – основание (подошва или башмак), 2 – осветитель, 3 – светофильтр, 4 – конденсор Аббе, 5 – предметный столик, 6 – объективы, 7 – револьверная головка, 8 – монокулярная насадка, 9 – окуляр, 10 – штатив (тубусодержатель), 11 – измерительный нониус, 12 – ограничительный винт, 13 – держатель препарата, 14 – ручка грубой настройки (макровинт), 15 – ручка точной настройки (микровинт), 16 – рукоятка перемещения конденсора (винт конденсора).

Все объективы делят на сухие и иммерсионные (погруженные в масло или воду). У сухих между фронтальной линзой и рассматриваемым препаратом находится воздух, у иммерсионных пространство между линзой и препаратом заполнено маслом (кедровым, касторовым, гвоздичным и др.) или водой. Объективы бывают разных увеличений: к сухим относят увеличения $\times 4$, $\times 8$, $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$, к

иммерсионным $\times 90$, $\times 100$, $\times 110$. Также на иммерсионных объективах имеются обозначения МИ (масляная иммерсия) или OIL (масло).

б) окуляры (рисунок 1 - 9) вставлены в верхнюю часть тубуса. Они состоят из двух плосковыпуклых линз, обращенных выпуклыми сторонами к объективу, и заключены в металлическую оправу. Между линзами имеется постоянная металлическая диафрагма. Линза, обращенная к глазу, называется глазной, к объективу – собирательной (или полевой). Короткие окуляры дают более сильное увеличение, длинные – слабое.

Окуляры бывают разных увеличений и в зависимости от этого обозначаются: $\times 7$, $\times 10$, $\times 15$, $\times 16$, $\times 18$, $\times 20$.

Цифры на объективах и окулярах показывают увеличение этих систем. Зная эти цифры можно подсчитать увеличивающую способность микроскопа, которая равна произведению увеличения объектива на увеличение окуляра. Так, при увеличении объектива $\times 8$ и окуляра $\times 7$ увеличение микроскопа равно 56, объектива $\times 90$ и окуляра $\times 20$ – 1800.

в) осветительный аппарат - находится под предметным столиком и представлен конденсором Аббе (рисунок 1 - 4) с ирисовой диафрагмой и осветителем (рисунок 1 - 2) или зеркалом.

Конденсор Аббе состоит из двух линз, заключенных в металлическую оправу и предназначенных для собирания лучей света, идущих от осветителя или зеркала. Ирисовая диафрагма находится под конденсором и служит для регулирования освещения препарата путем сужения или расширения ее при помощи рычага. Окрашенные препараты, частично задерживающие свет, рассматривают при открытой диафрагме. Неокрашенные препараты (висячую или придавленную капли) рассматривают с полуоткрытой диафрагмой в слабом пучке света. В таком поле зрения увеличивается контрастность неокрашенных форм микробов, что облегчает их нахождение.

Осветитель состоит из встроенной в микроскоп лампы, включающейся от сети.

Зеркало имеет плоскую и вогнутую поверхности и служит для отражения лучей света. Плоским зеркалом пользуются при хорошем естественном освещении и при микрофотосъемках, вогнутым – при искусственном и слабом естественном освещении.

В настоящее время применяются объемные микроскопы, которые позволяют рассматривать исследуемый объект в трех измерениях. Такой эффект достигается путем смены фокусного расстояния 50 раз в минуту, создавая оптическое впечатление объемности.

В проекционных микроскопах большое значение имеет освещенность препаратов. Чем она выше, тем лучше видимость. К ним относится лазерный микроскоп с мощным усилителем света, который в отличие от других подобных источников не разрушает биологические объекты и позволяет проецировать изображение на экран.

Правила работы с микроскопом. Приступая к работе с микроскопом, необходимо поднять конденсор до уровня предметного столика, открыть ирисовую диафрагму. Поворотом револьвера установить объектив с наименьшим увеличением ($\times 4$, $\times 8$ или $\times 10$). Включают осветитель или, глядя в окуляр, зеркалом направляют лучи света в микроскоп. Глядя в окуляр, вначале макровинтом ищут изображение,

затем микровинтом наводят резкость. Объективы малого увеличения ($\times 4$ - $\times 10$) применяют главным образом для предварительного осмотра препарата, объективы среднего увеличения ($\times 20$, $\times 40$) – для изучения крупных клеток микроорганизмов (например, грибов); эти объективы называются сухими, поскольку при микроскопии между фронтальной линзой и препаратом находится воздух. При этом благодаря различию показателей преломления воздуха ($n=1$) и стекла ($n=1,52$) часть лучей, освещающих препарат, рассеивается и не попадает в объектив.

Объективы больших увеличений ($\times 85$, $\times 90$, $\times 100$) носят название иммерсионных. При работе с ними необходима максимальная освещенность препарата; устранение рассеивания, неизбежного при работе с сухими объективами, в данном случае достигается путем использования иммерсионных жидкостей, у которых показатель преломления близок к показателю преломления стекла.

Вначале под малым увеличением микроскопа наводят свет и определяют на препарате участок микроскопирования. Затем на выбранное место наносят каплю иммерсионного масла и осторожно (под контролем глаз с боку) погружают в нее фронтальную линзу иммерсионного объектива ($\times 90$) и медленно поднимают объектив макрометрическим винтом до появления контуров изображения. После грубой наводки руки переводят на микрометрический винт и осуществляют более точную фокусировку.

По окончании работы объектив поднимают, убирают препарат, а с фронтальной линзы спиртовым ватным тампоном убирают остатки масла.

Морфология микроорганизмов. По форме микроорганизмы подразделяют на три основные группы: шаровидные (кокки), палочковидные (цилиндрические) и извитые.

Шаровидные формы (кокки, рисунок 2) – греч. *coccus* – зерно, шарик. В зависимости от расположения клеток после их деления в одной, двух и трех взаимно перпендикулярных плоскостях кокки подразделяют на:

1) микрококки (монококки) – одиночно или беспорядочно расположенные клетки шаровидной формы (рисунок 2а), образуются делением в разных плоскостях, в диаметре не превышают 0,5 мкм. Они являются сапрофитами, постоянными обитателями воды, воздуха;

2) диплококки – кокки, располагающиеся попарно (греч. *diploos* - двойной), рисунок 2б. Делятся в одной плоскости, как результат деления одной особи. Они неподвижны, не образуют спор. Имеются сапрофитные формы - в почве, водоемах, патогенные – пневмококки, менингококки и др.;

3) стрептококки – (греч. *streptos* – плетеный, витой, цепь) деление их происходит в одной плоскости и образующиеся клетки располагаются цепочками различной длины (рисунок 2в). Подразделяются на патогенные – возбудители многих инфекционных болезней; фекальные (энтерококки) – обитатели кишечника; полезные – молочнокислые: встречаются на различных растениях, в молоке, используются для получения молочнокислых продуктов (*Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*);

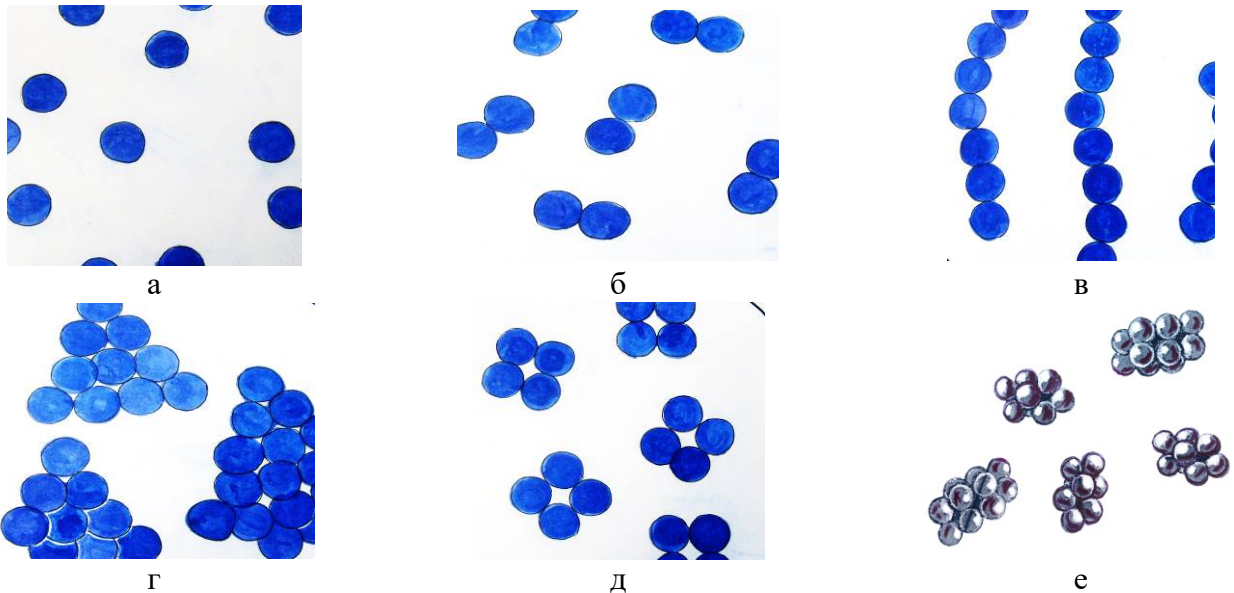


Рисунок 2 Шаровидные формы микроорганизмов

а – микрококки, б – диплококки, в – стрептококки, г – стафилококки, д – тетракокки, е – сарцины.

4) стафилококки – (греч. staphyle – виноградная гроздь) делятся в различных плоскостях без особой закономерности, образуя беспорядочное скопление клеток, иногда напоминающее грозди винограда (рисунок 2г). Являются возбудителями (чаще всего *Str. aureus*) различных гнойно-воспалительных процессов (абсцессов, флегмон, фурункулов, карбункулов, остеомиелитов, гнойных плевритов, ангин, сепсиса, маститов и др.), пищевых токсикоинфекций и т.д.

5) тетракокки – сочетание шаровидных микробов по четыре (греч. tetra – четыре), рисунок 2д. Деление клеток происходит в двух взаимно перпендикулярных плоскостях, это почвенные микроорганизмы;

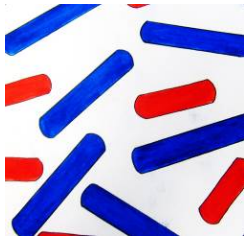
6) сарцины (лат. sarcio – соединять, связывать) – кокки, соединенные в виде «пакетов» или «тюков» по 8, 16, 32 и т.д. клеток в результате деления в трех взаимно перпендикулярных плоскостях (рисунок 2е). Среди них болезнетворных видов не обнаружено, это почвенные микроорганизмы.

Палочковидные формы. Самая многочисленная и разнообразная группа. Величина палочковидных форм колеблется от нескольких долей микрометра до 10-15 мкм и более: различают короткие, длинные, тонкие и толстые палочки. Концы у них иногда закруглены или резко обрублены. Форма их может быть цилиндрическая или овальная. Некоторые палочковидные бактерии имеют разветвленную (микобактерии) или овоидную (пастереллы) форму.

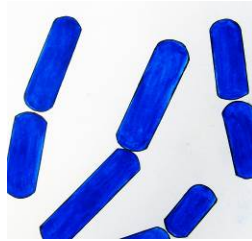
Различают палочки, не образующие спор (бактерии) и образующие споры в неблагоприятных условиях (бациллы, клостридии).

К не образующим спору относят:

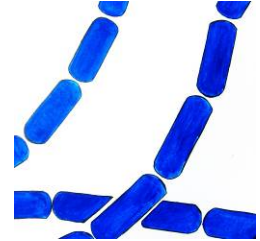
1) бактерии – имеют цилиндрическую форму и не образуют спор. Могут располагаться в мазках одиночно (рисунок 3а), попарно (диплобактерии, рисунок 3б) и цепочками (стрептобактерии, рисунок 3в).



а



б



в

Рисунок 3 Бактерии

а – бактерии, б – диплобактерии, в - стрептобактерии

К образующим спору относят:

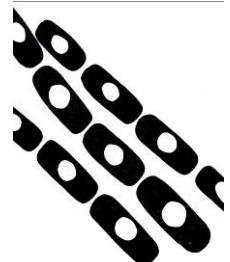
2) **бациллы** – спорообразующие палочки, образующие при неблагоприятных условиях (вне организма) споры. Диаметр споры меньше ширины клетки. Могут располагаться в мазках одиночно (рисунок 4а), попарно (диплобациллы, рисунок 4б) и цепочками (стрептобациллы, рисунок 4в). Большинство из них сапрофиты: картофельная бацилла, сенная бацилла, капустная бацилла, грибовидная бацилла; некоторые служат возбудителями болезней, напр. *Bac. anthracis*.



а



б



в

Рисунок 4 Бациллы

а – бациллы, б – диплобациллы, в - стрептобациллы

3) **кlostридии** (греч. *closter* – «веретено») – спорообразующие палочки, диаметр их споры превышает ширину микробной клетки. Поэтому в процессе спорообразования клетки *кlostридий* изменяют свою конфигурацию. Спора округлой или овальной формы, располагается центрально (рисунок 5а), терминально (рисунок 5б) или субтерминально. Они являются возбудителями *кlostридиозов*: эмфизематозного карбункула, злокачественного отека, бродзота, столбняка, ботулизма и др.



а



б

Рисунок 5 Кlostридии а - *кlostридии* с центральным расположением спор;
б - *кlostридии* с терминальным расположением спор

Извитые формы. Это тонкие бактерии, тело которых спиралевидно изогнуто (рисунок 6). В зависимости от степени поворота тела клетки вокруг своей оси различают вибрионы, спираиллы и спирохеты.



а



б



в

Рисунок 6 Извитые формы а – вибрионы, б – спираиллы, в - спирохеты

1) **Вибрионы** (лат. *vibrio* – трепещущий, вибрирующий) имеют форму слегка изогнутой запятой (рисунок 6а). Поворот тела вокруг своей оси не превышает четверти оборота. На конце клетки имеется жгутик. Они могут встречаться в различных таксономических группах (возбудители кампилобактериоза (вибриоза) сельскохозяйственных животных и холеры человека).

2) **Спириллы** (лат. *spiro* - штопор) характеризуются небольшим числом крупных завитков. Чаще всего имеют 2-3 завитка (в виде «летающей чайки»), максимум 5. Передвигаются с помощью жгутиков. Рисунок 6б.

3) **Спирохеты** – имеют штопорообразную форму с большим количеством мелких, но крутых завитков (рисунок 6в). На конце тела пучком расположены жгутики, с помощью которых они осуществляют поступательное, сгибательное и вращательное движения.

6 Контрольные вопросы:

- 6.1 Какие основные задачи выполняет бактериологическая лаборатория?
- 6.2 Что в себя включает механическая часть микроскопа?
- 6.3 Что в себя включает оптическая часть микроскопа?
- 6.4 Как определить общую увеличивающую способность микроскопа?
- 6.5 Назовите основные принципы работы с иммерсионной системой
- 6.6 Каково назначение и правила работы с макро- и микрометрическими винтами микроскопа?
- 6.7 Какие формы микроорганизмов Вы знаете?
- 6.8 Какие группы шаровидных бактерий различают по их расположению?
- 6.9 На чем основано деление бактерий на собственно бактерии, бациллы и клостридии?
- 6.10 Какие морфологические группы имеются среди извитых форм?

Лабораторная работа №2

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КРАСКИ. ПРОСТОЙ СПОСОБ ОКРАШИВАНИЯ. ПОРЯДОК ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТА

1 Цель работы: Изучить наиболее часто употребляемые краски в микробиологической практике; ознакомиться с простым способом окрашивания препаратов; научиться готовить препарат для микроскопии.

2 Материалы и оборудование: набор бактериальных красок (фуксин, синька метиленовая), предметные стекла, дистиллированная вода, спички, спиртовки, фильтровальная бумага, спиртовые тампоны, микроскопы.

3 Общие сведения. В микробиологической практике микроорганизмы микроскопируют в неживом и живом состоянии. Для изучения морфологии, структурных элементов клетки, тинкториальных свойств (способность микробов к окраске) готовят специальные препараты (мазки).

4 Порядок выполнения работы. Ознакомиться с основными красителями, и изучить методику приготовления и окрашивания мазка простым способом.

5 Задание.

5.1 Изучить основные краски, применяемы для простого способа окрашивания;

5.2 Приготовить мазок из зубного налета для бактериоскопии;

5.3 Окрасить мазок простым способом с помощью одной краски;

5.4 Провести микроскопию мазка и определить основные формы микроорганизмов.

Бактериальные краски. Для окрашивания микробов используют анилиновые красители (основные, кислые и нейтральные). Растворы красителей могут быть спиртовыми или водными, которые готовят из сухих кристаллических или порошкообразных красителей. Наиболее часто употребляемыми красителями являются следующие:

-*красные* – фуксин основной феноловый (Циля), фуксин основной водоспиртовой (Пфейффера), фуксин кислый, сафранин, нейтральрот (нейтральный красный), эозин, конго красный;

-*синие* – синька метиленовая, синька Лёффлера, синька Виктория, водный синий, опаловый синий;

-*фиолетовые* – метилвиолет (метиловый фиолетовый), кристаллвиолет (кристаллический фиолетовый), генцианвиолет (генциановый фиолетовый);

-*зеленые* – малахитовая зелень, метиленовая зелень, бриллиантовая зелень, светло-зеленый;

-*желтые* – флюоресцин конго, пикриновая кислота;

-*коричневые* – хризоидин, везувин;

-*черные* – нигрозин.

Простой метод окрашивания (ориентировочный метод) - применение раствора какой-либо одной краски анилинового ряда (основные или кислые). Раствором краски покрывают охлажденный фиксированный мазок, выдерживают 2-5 минут. Чаще всего применяют фуксин основной (выдерживают 1-2 минуты) или

синьку метиленовую (выдерживают 3-5 минут). Этот способ окраски позволяет обнаружить в материале микроорганизмы и дать представления об их морфологии.

Препараты для микроскопирования готовят на обезжиренных предметных стеклах. Материалом служат взвеси бактериальных культур, выросших на питательных средах, молоко, гной, различные истечения и т.д. Из таких материалов готовят препараты-мазки. Из тканей различных органов – препараты-отпечатки.

Предметные стекла, используемые при этом, должны быть чистыми и хорошо обезжиренными. Стекла хранят в банках с притертыми пробками в смеси из равных частей этилового спирта и эфира или в 96,6% спирте-ректификате. Возможно, обезжиривание предметных стекол кусочком мыла.

Нанесение микробной взвеси на стекло производят бактериальной петлей. Бактериальные петли готовят из платиновых или нихромовых нитей в виде замкнутой петли, диаметром 2-3 мм.

В правильно приготовленном препарате микробные клетки должны быть расположены в один слой.

Обезжиривание предметного стекла. Стекла, не бывшие в употреблении, сначала моют в воде, затем выдерживают в смеси спирта-эфира и фламбируют над пламенем спиртовки. Стекла, бывшие в употреблении кипятят в течение 10 мин в 1% растворе натрия гидрокарбоната (соды), промывают в дистиллированной воде с добавлением 0,5% соляной кислоты с целью нейтрализации и окончательно споласкивают в дистиллированной воде.

Порядок приготовления препарата:

1. Берут чистое предметное стекло (обезжиренное);
2. Карандашом по стеклу чертят границы мазка (обратная сторона);
3. С лицевой стороны наносят мазок.

Для приготовления мазка из культуры, выращенной на плотной питательной среде, чашку с исследуемой культурой ставят перед собой крышкой вверх. Стерильной бактериологической петлей наносят небольшую каплю стерильного физиологического раствора на предметное стекло. Бактериальную петлю прокалывают докрасна (фламбируют), внося ее в пламя спиртовки вначале в вертикальном положении, затем наклонив петледержатель. Левой рукой приоткрывают крышку чашки Петри и вводят под неё обожженную петлю. Остудив петлю, набирают материал с колонии отмеченного участка. Вынимают петлю, закрывают чашку, и вносят в каплю стерильного физраствора, равномерно распределяя по поверхности стекла в пределах границы мазка в виде овала или круга диаметром 1-2 см. Петлю стерилизуют фламбированием (прокалывают).

Для приготовления мазка из культуры, выращенной в жидкой питательной среде, пробирку с культурой держат в левой руке между большим и указательным пальцами, пробкой к себе. В правой руке держат бактериальную петлю, и стерилизуют её в пламени спиртовки. Из пробирки с культурой вынимают пробку, захватывая ее мизинцем и ладонью правой руки. Вынув пробку, края пробирки обжигают и вносят в нее прокаленную бактериальную петлю через пламя спиртовки. Прежде чем захватить небольшое количество культуры, петлю охлаждают, касаясь стенок пробирки. Петлю с культурой осторожно вынимают, еще раз обжигают края пробирки, а культуру равномерно распределяют по стеклу в виде небольшого овала или круга (1,5-2 см в диаметре) в пределах границы мазка. По

окончании приготовления мазка петлю вновь стерилизуют прокаливанием (фламбируют).

4. Высушивают на воздухе;

5. Фиксируют мазок. Фиксацию мазка проводят физическим или химическим способами.

Физический способ – это фиксация над пламенем огня спиртовки или горелки. Для этого предметное стекло с мазком берут большим и указательным пальцами за ребра или пинцетом и проводят 3-4 раза над пламенем спиртовки, каждый раз, прикладывая стекло к коже руки до лёгкого жжения. Ощущение жжения свидетельствует о том, что мазок фиксирован. При этом бактерии погибают, плотно прикрепляясь к стеклу. Этот способ нельзя применять при исследовании клетки.

Химический способ - это применение для фиксации различных химических веществ. Для этого препараты погружают в фиксирующую жидкость: в метиловый спирт - на 5 минут, в этиловый спирт - на 10 минут, ацетон - 5 минут, смесь Никифорова (равный объем спирта и эфира) - на 15 минут. Химический способ используют для фиксации мазков из крови и мазков-отпечатков, чтобы не разрушать клеточные элементы.

Цель фиксации:

а) убить микробы, обезопасив себе работу;

б) прикрепить микробы к стеклу;

в) убитые микробы лучше окрашиваются.

6. Окраска мазка. Окрашивают в зависимости от выбранного метода (простым или сложным);

7. Смыть краску водой;

8. Осторожно высушивают фильтровальной бумагой;

9. Наносят каплю иммерсионного масла;

10. Микроскопируют под масляной иммерсией (МИ 90, МИ 100).

Препараты окрашивают простым или сложными методами.

6 Контрольные вопросы:

6.1 Какие различают бактериальные краски?

6.2 Какие краски чаще применяются для окрашивания простым способом;

6.3 Повторите порядок приготовления мазка для бактериоскопии.

6.4 Какие бывают методы фиксации мазка?

6.5 Какова цель фиксации мазка?

Лабораторная работа №3

СЛОЖНЫЕ СПОСОБЫ ОКРАШИВАНИЯ. ОКРАСКА ПО ГРАМУ

1 Цель работы: Изучить сложные способы окрашивания, ознакомиться с методами Грама, Циля-Нильсена, Козловского.

2 Материалы и оборудование: набор красок для сложных методов окрашивания, микроскопы, фильтровальная бумага, сливные чашки, предметные стекла, дистиллированная вода, культуры микроорганизмов.

3 Общие сведения. Сложные способы окрашивания основаны на физико-химических различиях состава микробных клеток и поэтому окрашиваются одними и теми же красителями по-разному и неодинаково отдают их при последующем обесцвечивании этиловым спиртом, кислотами и другими реактивами. Части микробной клетки избирательно реагируют на красящие растворы. Эти методы позволяют помимо морфологии бактерий, определить их тинкториальные особенности (различное окрашивание при использовании специальных методов) и наличие или отсутствие структурных элементов клетки (капсула, спора), что имеет важное дифференциально-диагностическое значение.

4 Порядок выполнения работы. Изучить сложные способы окрашивания и приготовить мазки.

5 Задание

5.1 Освоить основные сложные методы окраски;

5.2 Приготовить мазок из исследуемых культур;

5.3 Просмотреть мазки под иммерсионной системой;

5.4 Рассмотреть грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы.

Сложные методы окраски (дифференциальный метод) – применение растворов нескольких красителей и реактивов. В лабораторной практике применяют методы Грама (на все виды инфекции), Циля–Нильсена (для кислотоустойчивых микроорганизмов, например, возбудителя туберкулеза), Козловского (специальный способ окраски на бруцеллез), Михину, Ольту, Ребигеру (на капсулы) и др.

Окраска по Граму (общепринятая модификация) применяется при исследовании на любой вид инфекции. Микроорганизмы в зависимости от результатов окраски делят на две группы: грамположительные (G^{+}) и грамотрицательные (G^{-}).

На фиксированный мазок наносят:

1) полоску фильтровальной бумаги и наливают карболовый генцианвиолет (генциановый фиолетовый). Выдерживают 1-2 минуты, после чего снимают бумажку, сливают краску, промывают водой. *При этом все микроорганизмы окрашиваются в фиолетовый цвет;*

2) раствор Люголя, выдерживают 1-2 минуты (мазок чернеет), краситель сливают, не промывают. *При этом у G^{+} микробов фиксируется фиолетовое окрашивание, т.к. образуется комплексное соединение генцианвиолета с йодом. Под действием спирта этот комплекс не разрушается, и микробы остаются фиолетового цвета;*

3) 96% этиловый спирт, выдерживают 30 секунд – 1 минуту. Тщательно промывают мазок. *При этом G_r^+ остаются фиолетового цвета, а G_r^- обесцвечиваются, т.к. не удерживают основной краситель и вымывается спиртом.*

4) водный раствор фуксина или сафранина, выдерживают 1-2 минуты и промывают водой. При этом G_r^- микробы докрашиваются в красный цвет.

Мазок высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют.

Микроскопическая картина: грамположительные микроорганизмы окрашиваются в фиолетовый цвет, а грамотрицательные – в красный.

Окраску по Граму можно применять в видоизменении Синева, согласно которому вместо карболового генцианвиолета применяют окрашенные полоски фильтровальной бумаги*. Для окрашивания мазков на фиксированный мазок накладывают полоску фильтровальной бумаги, пропитанной спиртовым раствором кристаллвиолета, и наносят 2-3 капли воды, которые полностью впитываются бумагой, последняя плотно прилегает к стеклу. Выдерживают 2 минуты, затем бумагу удаляют пинцетом и дальнейшую окраску производят по Граму.

*Приготовление красящей бумаги по Синеву – В 100мл 96% этилового спирта растворяют 1 г кристаллвиолета и 1 см³ глицерина. Краску наливают в лоток. Бумагу нарезают полосками шириной 2,0 – 2,5 см и длиной 30 – 50 см. Полоску погружают на несколько секунд в краску так, чтобы она окрасилась с обеих сторон. Окрашенные полоски вынимают пинцетом, дают краске стечь и подвешивают на шпагате для высушивания. Бумагу сушат на воздухе при комнатной температуре 18 – 23⁰С. Высушенные полоски бумаги разрезают на кусочки размером 2×2 см и хранят в банке из темного стекла.

Окраска по Цию-Нильсену применяется для выявления кислотоустойчивых бактерий туберкулеза, имеющих в оболочке клеток большое количество липидов, воска и оксикислот. Для увеличения проницаемости клеточной стенки первый этап окрашивания проводят при подогревании.

На фиксированный мазок наносят:

1) небольшой кусок фильтровальной бумаги, наливают карболовый раствор фуксина Ция и подогревают над пламенем спиртовки до появления паров (два-три раза) в течение 5 минут, но, не доводя краситель до кипения, раствор краски при этом каждый раз добавляют. После охлаждения краску с бумажкой сливают и промывают водой. *При этом все микроорганизмы окрашиваются в красный цвет;*

2) 3% раствор солянокислого спирта** до достижения слабозаметного розового оттенка, тщательно промывают водой. *При этом все микроорганизмы обесцвечиваются, а кислотоустойчивые микроорганизмы остаются красного цвета;*

3) раствор метиленовой сини Леффлера, выдерживают 3-5 минут. Препарат промывают водой. *При этом обесцвеченные клетки докрашиваются в синий цвет, а кислотоустойчивые остаются красными.*

Мазок высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют.

Микроскопическая картина: кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в красный цвет (не обесцвечиваются кислотой), остальные - в синий (окрасившись первоначально фуксином в красный цвет, легко обесцвечиваются солянокислым спиртом и воспринимают дополнительную окраску метиленовой сини).

****Солянокислый спирт** – берут 3мл концентрированной соляной кислоты и добавляют 97мл 70% этилового спирта.

Окраска по Козловскому применяется для выявления бруцелл и окраски музейных культур. Этот метод основан на свойстве бруцелл более медленно воспринимать некоторые краски, в частности растворы сафранина, по сравнению с посторонними микроорганизмами, наиболее часто встречающимися в обследуемых материалах. По Козловскому очень показательно окрашиваются присылаемые в лабораторию мазки, приготовленные из выделений матки, плаценты, сычуга и других органов абортированного плода, плодных оболочек, гноя и др. При исследовании выделений из матки бруцеллы могут быть обнаружены внутри лейкоцитов. На фиксированный мазок наносят:

1) 2% водный раствор сафранина с подогреванием до появления пузырьков, промывают водой. *При этом все микроорганизмы окрашиваются в красный цвет ;*

2) 1% водный раствор малахитовой зелени, выдерживают 0,5-1 мин, промывают водой. *При этом бруцеллы остаются красного цвета, а остальная микрофлора окрашивается в зелёный цвет.*

Мазок высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют.

Микроскопическая картина: бруцеллы окрашиваются в красный цвет, а вся остальная микрофлора в зеленый.

6 Контрольные вопросы:

- 6.1 Назовите красители, применяемые в микробиологии.
- 6.2 Какие существуют способы и цели фиксации.
- 6.3 Порядок приготовления препарата для микроскопии.
- 6.4 Простой метод окраски.
- 6.5 Методика приготовления мазка.
- 6.6 Способы обработки предметных и покровных стекол.
- 6.7 Какие различают сложные методы окрашивания?
- 6.8 Какова методика окраски по Граму?
- 6.9 С какой целью окрашивают по Цилю-Нильсену?

Лабораторная работа №4

ОКРАСКА СПОР И КАПСУЛ. ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ПОДВИЖНОСТЬ

1 Цель работы: Изучить способы окраски спор и капсул; ознакомиться с методиками исследования микроорганизмов на подвижность.

2 Материалы и оборудование. Плакаты с методиками окраски спор и капсул, плакаты с формами и расположением спор, набор красок для окраски спор и капсул, бактериальные культуры для изучения подвижности, предметные стекла с луночкой и без луночки, покровные стекла, бактериальные петли, вазелин, микроскопы.

3 Общие сведения. В структуре микробной клетки различают постоянные и непостоянные элементы. К постоянным элементам клетки относится цитоплазма, оболочка, ядерное вещество; к непостоянным – спора, капсула, жгутики.

4 Порядок выполнения работы. Изучить способы окраски спор и капсул и методы исследования микроорганизмов на подвижность.

5 Задание

5.1 Изучить способы окраски спор;

5.2 Изучить способы окраски капсул;

5.3 Приготовить мазок «раздавленная капля»;

5.4 Приготовить мазок «висячая капля»;

5.5 Изучить подвижность микроорганизмов под малым увеличением микроскопа.

Окраска спор. Спора – это уплотненная часть цитоплазмы, покрытая многослойной оболочкой, пропитанная смолистыми и липидными веществами, содержащими большое количество кальция.

Некоторые палочковидные микроорганизмы образуют споры при неблагоприятных условиях внешней среды (почве, воде, питательных средах, кормах). При образовании споры цитоплазма клетки сгущается, сжимается, уменьшается свободная вода до 40% и покрывается многослойной оболочкой. Химический состав спор обеспечивает их высокую стойкость к нагреванию, высушиванию, действию кислот, щелочей, спиртов, красителей. При законченном спорообразовании спора лежит свободно, без остатков вегетативной клетки. Споры имеют округлую или овальную форму, располагаются центрально, терминально или субтерминально. В диаметре они могут быть меньше или больше ширины клетки. Споры окрашивают сложными методами, т.к. они имеют плотную оболочку. Все методы окраски спор основаны на обеспечении проникновения красителя через трудноокрашиваемую оболочку споры. Перед окрашиванием изменяют порозность оболочки спор с помощью протравителей (соляную или хромовую кислоты) или раствор фенола при подогревании. При этом краситель хорошо адсорбируется, спора не обесцвечивается при воздействии кислотой. Вегетативные тела микробных клеток при действии кислотой обесцвечиваются и докрашиваются при дополнительном окрашивании.

Окраска спор методом Златогорова (окрашивают без протравы).

На фиксированный мазок наносят:

1) кусок фильтровальной бумаги, окрашенный фуксином основным феноловым Циля, и капают 3-5 капель воды, окрашивают 5-7 мин при подогревании, нанося по каплям воду. *При этом вегетативные клетки и споры окрашиваются в красный цвет;*

2) 3% водный раствор серной кислоты на 5-10 сек и промывают водой. *Под действием серной кислоты вегетативные клетки обесцвечиваются, а споры остаются красными;*

3) раствор метиленовой сини, выдерживают 2-3 мин, промывают водой. *Синька метиленовая докрашивает вегетативные клетки в синий цвет.*

Высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют.

Микроскопическая картина: споры окрашиваются в красный цвет, вегетативные клетки – в синий.

Окраска спор методом Пешкова. На фиксированный мазок наносят:

1) метиленовый голубой Лёффлера, выдерживают 15-20 сек над пламенем спиртовки и промывают водой.

2) 0,5% водный раствор нейтральрота (нейтральный красный), выдерживают 30 сек, промывают водой.

Высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют.

Микроскопическая картина: споры голубые или синие, молодые споры – черно-синие, вегетативные формы – розовые, включения (хроматиновые) – фиолетовые.

Окраска капсул. Капсула – толстый слизистый слой (муциноподобное вещество) вокруг микробной клетки состоящей из липополисахаридов, который синтезируется в цитоплазме и секретируется на поверхность клеточной стенки.

Капсула играет важную роль при диагностике и дифференциации возбудителей инфекционных заболеваний. Патогенные микроорганизмы образуют капсулу в инфицированном организме защищаясь от фагоцитоза, редко на искусственных средах. Химический состав капсул неоднородный: одни из них состоят из комплекса белков, другие – из полисахаридов. Капсула слабо преломляет свет, поэтому в неокрашенных мазках их трудно обнаружить. Капсула и сама клетка имеют разный химический состав, поэтому при окрашивании одной краской красятся в различные цвета: бактериальная клетка красится в цвет применяемой краски, а капсула приобретает какой-либо оттенок. Существует несколько методов окрашивания капсул. Капсульное вещество плохо окрашивается, поэтому при приготовлении препарата для обнаружения капсулы выполняют следующие правила:

1. Мазок готовят из свежего материала, так как капсула быстро лизируется.

2. Фиксируют мазок химическим способом, для окраски применяют метакрохроматические краски, то есть при использовании, которых цитоплазма окрашивается в один цвет, а капсула - в другой;

3. Промывать мазок водой следует слабо и кратковременно.

Окраска капсул методом Михина. На фиксированный мазок наносят:

1) Метиленовый голубой Леффлера (лучше старым раствором), окрашивают 2-3 мин. при подогревании.

2) Промыть водой, обсушить.

Микроскопическая картина: тело микробной клетки темно-синего цвета, капсула – светло-розового.

Окраска капсул методом Ольта. На фиксированный мазок наносят:

1) 2%-ный водный раствор сафранина* (свежеприготовленный, горячий), окрашивают 1-3 минут.

2) Промыть водой, обсушить.

Микроскопическая картина: тело клетки окрашивается в кирпично-красный цвет, капсула – в светло-желтый.

*Раствор сафранина готовят перед употреблением: сафранин растворяют в воде, доведенной до кипения и фильтруют через бумажный фильтр.

Окраска капсул методом Ребигера

Окрашивают нефиксированные мазки. Мазки окрашивают и фиксируют одновременно. На мазок наносят:

1) Раствор Ребигера*, выдерживают 15 – 20 сек.

2) Промыть водой, обсушить.

Микроскопическая картина: тело клетки окрашивается в темно-фиолетовый цвет, а капсулы – в красно-фиолетовый.

*Раствор Ребигера – берут 15-20 гр генцианвиолета растворяют в 100 см³ 40%-ного формалина. Раствор оставляют на 8-10 ч при температуре 20⁰С, фильтруют, после чего он готов к употреблению.

Исследование микроорганизмов на подвижность. Некоторые микроорганизмы в живом состоянии способны передвигаться. Различают пассивное (броуновское движение) и активное движение. Пассивное движение (броуновское) осуществляется потоком среды, в которой находятся микроорганизмы, например, с потоком воды или воздуха. Активное движение клеток приводится с помощью жгутиков, осуществляющих вращательные движения. Расположение их на теле микробной клетки различное. Жгутики бывают различной длины. Их диаметр настолько мал, что они невидимы в световом микроскопе (менее 0,2 мкм). У разных групп бактерий количество и расположение жгутиков неодинаково. Жгутики плохо воспринимают красители. Методы сложной окраски искажают подлинный вид жгутиков, поэтому в лабораториях окраску жгутиков не осуществляют, а исследуют бактерии в живом состоянии. Скорость и характер движения зависят от возраста культуры, окружающей среды и вида микроба. Молодые особи более подвижны, чем старые. С накоплением продуктов жизнедеятельности подвижность микроорганизмов прекращается. Подвижность микроорганизмов один из признаков при определении их вида.

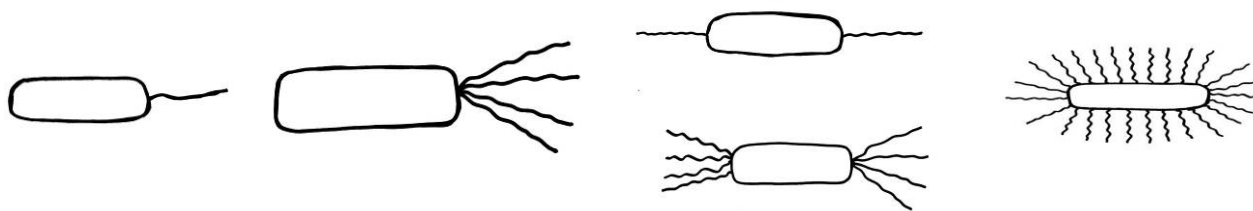
В зависимости от расположения и количества жгутиков (рисунок 7) микроорганизмы подразделяют на:

а) монотрихи - микроорганизмы, имеющие на одном из полюсов один жгутик. Самые подвижные клетки, движения активные, поступательные (род *Pseudomonas*);

б) лофотрихи - микроорганизмы, имеющие на одном из полюсов пучок жгутиков, движения активные, поступательные (род *Listeria*);

в) амфитрихи - микроорганизмы, имеющие по одному или несколько жгутиков на обоих полюсах микробной клетки, передвигаются беспорядочно;

г) перитрихи - микроорганизмы, у которых жгутики расположены по всей поверхности клетки, передвигаются беспорядочно (*E. coli*).



а - монотрихи

б - лототрихи

в - амфитрихи

г - перитрихи

Рисунок 7 Типы расположения жгутиков у бактерий

Для определения подвижности у бактерий необходимо использовать молодые культуры (12 – 24 часовые), так как старые культуры утрачивают способность передвигаться. Исследование проводят путем приготовления препаратов «висячей» или «раздавленной» капли.

Метод «висячая капля». Висячую каплю готовят на предметном стекле с углублением (луночкой).

- 1) Берут чистое предметное стекло с луночкой;
- 2) Края луночки смазывают тонким слоем вазелина;
- 3) На покровное стекло наносят каплю исследуемой культуры.

Если они выращены в жидкой среде, берут каплю такой культуры, если на плотной, то сначала на покровное стекло наносят каплю изотонического раствора натрия хлорида, а затем в неё культуру микробов;

4) Предметное стекло проворачивают на 180° и аккуратно опускают на покровное так, чтобы капля оказалась в центре углубления, после чего его возвращают в прежнее положение. В таком препарате капля подвешена с внутренней поверхности покровного стекла и находится в герметически закрытой влажной камере. Это позволяет наблюдать за движением микробов в течение длительного времени;

5) Микроскопируют под увеличением $\times 40$, в слегка затемненном поле зрения микроскопа, что увеличивает контрастность неокрашенных форм.

Метод «раздавленная капля» служит для кратковременного наблюдения под микроскопом за морфологией и движением живых микробов.

- 1) Берут чистое предметное стекло;
- 2) Наносят каплю исследуемой взвеси;

3) Осторожно накрывают покровным стеклом без образования пузырьков воздуха. Слой жидкости должен быть такой толщины, чтобы стекла склеились. Лишнюю жидкость осторожно впитывают углом кусочка фильтровальной бумаги;

4) Микроскопируют под увеличением $\times 40$, в слегка затемненном поле зрения микроскопа, что увеличивает контрастность неокрашенных форм. Следует иметь в виду, что препарат быстро охлаждается и высыхает.

6 контрольные вопросы:

- 6.1 Что такое капсула?
- 6.2 Что такое спора?
- 6.3 Какие существуют способы окраски на споры и капсулы?
- 6.4 Как исследуют микроорганизмы на подвижность?
- 6.5 Как готовят препарат «Висячая капля»?
- 6.6 Как готовят препарат «Раздавленная капля»?

Лабораторная работа № 5

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ. ТЕХНИКА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

1 Цель работы: Изучить основные питательные среды, применяемые в микробиологической практике; освоить технику посева на различные питательные среды.

2 Материалы и оборудование: сухие питательные среды-полуфабрикаты, жидкие, плотные и полужидкие питательные среды в пробирках и чашках Петри, бактериальные петли, бактериальные иглы, бактериальные культуры, спиртовки.

3 Общие сведения. Питательные среды – это комплекс питательных веществ различного происхождения, который готовится в зависимости от физиологических потребностей микроорганизмов.

4 Порядок выполнения работы. Изучить основные питательные среды и сделать посевы.

5 Задание.

5.1 Освоить классификацию питательных сред;

5.2 Освоить порядок приготовления питательных сред;

5.3 Изучить требования, предъявляемые к питательным средам;

5.4 Сделать посев на питательные среды.

Питательные среды классифицируют по физическим свойствам (по консистенции), по применению (по целевому назначению) и по происхождению (по химическому составу).

Классификация питательных сред по физическим свойствам (по консистенции). По консистенции питательные среды дифференцируют на:

- жидкие, их готовят, используя экстракты, гидролизаты, растворы из исходных продуктов. Например, к ним относят мясопептонный бульон (МПБ).

- плотные, их готовят, используя жидкие питательные среды с добавлением уплотнителя агар-агара, которые придают среде необходимую консистенцию. Например, к ним относят мясопептонный агар (МПА);

- полужидкие, их готовят, используя жидкие питательные среды с добавлением уплотнителей: агар-агара* или желатина**, которые придают среде необходимую консистенцию. Например, к ним относят мясопептонный желатин (МПЖ);

Также различают сухие питательные среды – это среды полуфабрикаты, выпускаемые на биофабриках.

*Агар-агар (малайское желе) - полисахарид, продукт переработки некоторых морских водорослей. Плавится при 80 - 86°C, затвердевает при 40°C. Для получения плотных сред его добавляют в количестве 1,5 - 2%, реже 3%; полужидких – 0,3 - 0,7%.

**Желатина – экстракт из тканей, содержащих много коллагена (кости, хрящи, сухожилия и т.д.). Желатиновый гель плавится при 25°C, что делает его неудобным для выращивания микроорганизмов с температурным оптимумом 37 - 38°C. Кроме того, ряд бактерий выделяют протеолитические ферменты, разлагающие желатину. Обычно в питательные среды вносят 10 - 20% желатины.

Классификация питательных сред по применению (по целевому назначению). По целевому назначению различают общепотребительные (основные), обогащенные, специальные, элективные (избирательные) и дифференциально-диагностические питательные среды.

Общепотребительные (основные) среды применяют при исследовании на любой вид микроорганизмов и для культивирования относительно неприхотливых микроорганизмов.

Основой для приготовления большинства питательных сред служит мясная вода, перевар Хоттингера или растительные гидролизаты.

Мясная вода: берут 1 кг мяса (лучше конину или говядину), освобождают от костей, жира, сухожилий и пропускают через мясорубку. 1 кг мясного фарша заливают 2л водопроводной воды (в соотношении 1:2) и кипятят 1 ч. После кипячения мясную воду охлаждают, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, затем доливают воду до первоначального объема, разливают по емкостям, закрывают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют автоклавированием при 120°C, 1 атм, 15-20 мин.

На основе мясной воды готовят мясопептонный бульон (МПБ).

Мясопептонный бульон (МПБ). Берут 1 л мясной воды, добавляют 10 гр (1%) пептона и 5 гр (0,5%) химически чистого хлорида натрия, кипятят 5 минут, устанавливают необходимый рН дробным добавлением 10%-го раствора гидроксида натрия или калия. Фильтруют, разливают по колбам и пробиркам, стерилизуют автоклавированием при 120°C, 1 атм, 15-20 мин.

На основе МПБ готовят мясопептонный агар (МПА) и мясопептонный желатин (МПЖ).

Мясопептонный агар (МПА). Берут 1л МПБ, добавляют 15-20 гр (1,5-2%) промытого, мелко нарезанного агар-агара, нагревают до расплавления агара, доводят до кипения. В горячем виде проверяют рН, затем, если необходимо, доводят его до нужного значения (7,2-7,6), фильтруют. Профильтрованный горячий агар разливают по пробиркам или чашкам Петри, стерилизуют автоклавированием при 112°C (0,5 атм) 15-20 мин.

Чтобы получить скошенную поверхность агара, удобную для посева, после стерилизации пробирки с расплавленным МПА оставляют при комнатной температуре до уплотнения в наклонном положении (конец с пробкой приподнят).

Широко используют плотные питательные среды в чашках Петри. Диаметр стандартной чашки Петри около 10 см. Над пламенем спиртовки или горелки наливают до 20 мл расплавленного и охлажденного до 40 – 45°C МПА, чашки помещают на горизонтальную поверхность до застывания.

Мясопептонный желатин (МПЖ). Берут 1л МПБ добавляют 100-200 гр (10-20%) измельченной желатины или 3-7 гр (0,3-0,7%) агар-агара, нагревают до расплавления уплотнителя, доводят до кипения, устанавливают рН 7,2-7,4, фильтруют, горячим разливают по пробиркам и стерилизуют в автоклаве при 112°C (0,5 атм) 15-20 мин или дробно в аппарате Коха три дня по 20 мин.

Обогащенные среды – это основные (общеупотребительные) питательные среды обогащенные кровью, сывороткой крови, углеводами и т.д. Применяют при исследовании микроорганизмов плохо растущих на общеупотребительных питательных средах. К питательным средам такого типа относят сывороточный и кровяной агары и бульоны и др.

Сывороточный и кровяной агары: к расплавленному и охлажденному до 45-50°C стерильному питательному агару добавляют 5-10% стерильной дефибринированной крови барана (кролика) или сыворотки крови (лошади, КРС, кролика). Для получения дефибринированной крови у барана кровь берут асептично из яремной вены стерильной иглой в стерильный флакон (или колбочку) со стеклянными (фарфоровыми) бусами или шариками, встряхивают вращательными движениями 15-20 мин, чтобы предотвратить свертывание крови. Фибрин остается на бусах. Компоненты перемешивают, разливают в чашки Петри, пробирки и оставляют до застывания питательной среды.

Сывороточный и кровяной бульоны готовят аналогичным образом.

Растворы углеводов (глюкоза и др.) стерилизуют текучим паром или фильтрованием и добавляют в количестве 0,5-1% к питательной среде.

Специальные среды – это питательные среды, разработанные с учетом специфических ростовых потребностей микроорганизмов. К питательным средам такого типа относят МППБ Китта-Тароцци и др.

Мясопептонный печеночный бульон (МППБ) Китта-Тароцци. Предварительно готовят печеночную воду: печень крупного рогатого скота промывают, очищают и нарезают мелкими кусочками, заливают водой в соотношении 1:1, кипятят, фильтруют, стерилизуют. Полученную печеночную воду смешивают с МПБ в соотношении 2:1 (на 2 л МПБ + 1 л печеночной воды). Кипятят, устанавливают pH, разливают по пробиркам (по 8-10 мл). Перед разливом среды в пробирки кладут кусочки вареной печени, сверху среду заливают 1-2 мл вазелинового масла, стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм. 30 мин.

Элективные (избирательные) среды (лат. electus – избранный) - это питательные среды для избирательного выделения и накопления микроорганизмов определенного вида из материалов, содержащих несколько видов микробов. Элективные среды чрезвычайно многообразны по своему составу. В них включают компоненты, обеспечивающие преимущественно рост искомого микроорганизма и (или) подавляющие в той или иной степени рост сопутствующей микрофлоры. По консистенции среды данного типа могут быть плотными и жидкими. Жидкие элективные среды называют средами обогащения или накопления, их применяют, когда ставят цель увеличить количество искомого микроорганизма в смешанной популяции. К питательным средам такого типа относят молочно-солевой агар, среду Кауфмана и др.

Молочно-солевой агар предназначен для избирательного культивирования стафилококков. К расплавленному МПА с pH 7,2-7,4, содержащему 5-7,5% хлорида натрия добавляют 10% стерильного обезжиренного молока, перемешивают и разливают в чашки Петри.

Среда Кауфмана – это среда обогащения для сальмонелл. К 100 мл среды Мюллера добавляют 1 мл водного раствора бриллиантового зеленого, разведенного 1:1000 и 5 мл стерильной бычьей желчи. Смесь стерилизуют текучим паром 30 мин.

Дифференциально-диагностические среды – это питательные среды, предназначенные для выявления ферментов у микроорганизмов. По консистенции могут быть жидкими, полужидкими, плотными. В состав этих сред входят основная питательная среда, обеспечивающая рост изучаемого микроорганизма, субстрат для обнаружения фермента и индикатор, по изменению цвета которого судят о сдвиге рН среды в результате расщепления субстрата. К питательным средам такого типа относят среды Гисса, Эндо, Левина, Плоскирева и др.

Среда Гисса используют для изучения ферментативных свойств выделенных культур микроорганизмов. Выпускают сухие среды Гисса с индикатором ВР – смесь водно-голубого с розоловой кислотой (готовые среды – полужидкой консистенции).

Плотные дифференциально-диагностические среды применяют для первичной изоляции возбудителей из материала. В их состав нередко кроме известного субстрата входят вещества, придающие питательной среде селективные свойства.

Среда Эндо содержит лактозу в качестве субстрата и предназначена для дифференциации бактерий, различающихся по способности расщеплять лактозу. Готовая среда бесцветна, при росте на ней микроорганизмов, расщепляющих лактозу, среда окисляется, обесцвеченный фуксин восстанавливается, и колония микроорганизма, например эшерихий, приобретает красный цвет с металлическим оттенком.

Среда Левина. Аналогична по целевому назначению среде Эндо, но содержит другой индикатор - эозин с метиленовым синим. Колонии лактозопозитивных бактерий на этой среде окрашены в фиолетово- черный цвет.

Агар Плоскирева предназначен для выделения сальмонелл, содержит лактозу в качестве субстрата и компоненты, подавляющие рост сопутствующей микрофлоры. Среду выпускают в виде порошка, в ее состав кроме питательной агаровой основы входят: желчные соли, цитрат натрия, тиосульфат натрия, фосфат натрия, бриллиантовый зеленый, кальцинированная сода, хлорид натрия, нейтральный красный. Готовая среда прозрачная или розоватая. Колонии сальмонелл бесцветные, эшерихий – брусничного цвета.

Классификация питательных сред по происхождению (по химическому составу). По химическому составу питательные среды дифференцируют на среды неопределенного химического состава и среды известного химического состава.

Среды неопределенного химического состава подразделяют на:

- среды животного происхождения (исходные продукты – мясо, рыба, яйца, молоко и т.д.).

Молоко (обезжиренное) - естественная среда животного происхождения. Молоко слегка подщелачивают добавлением 1%-ной двууглекислой соды, проверяют реакцию лакмусовой бумажкой – легкое посинение ее свидетельствует о слабощелочной реакции молока. Фильтруют, разливают в стерильные пробирки, стерилизуют текучим паром дробно.

- среды растительного происхождения (исходные продукты – соя, горох, картофель, морковь, капуста и т.д.). Готовят картофельные среды, морковные, гороховые, капустные и др.

Картофельные среды (ломтики или картофельная каша). Вымытый картофель очищают от кожуры и глазков, нарезают ломтиками цилиндрической формы, затем их разрезают по диагонали на две части (чтобы была плоская поверхность для посева бактерий), погружают в 1%-ный раствор двууглекислой соды на 1-2 ч, затем просушивают фильтровальной бумагой и помещают в специальные пробирки с перетяжкой в ее нижней трети (пробирки Ру). На дно пробирки до перетяжки наливают 5%-ную глицеринизированную воду. Стерилизуют при 120°C 20 мин.

Среды из кашеобразного картофеля и из гороха наибольшее применение нашли в биологической промышленности. Процесс приготовления этих сред сложный, длительный. В диагностической бактериологической работе применяют очень редко.

Некоторые продукты используют в натуральном виде (картофель, морковь, молоко и т.д.), но чаще животные и растительные ткани подвергают различной обработке (экстрагированию, ферментативному или кислотному гидролизу).

Среды известного химического состава (синтетические) готовят из химически чистых, растворимых в воде веществ в строго определенных количествах – различных солей, углеводов, витаминов и др. Синтетические среды бывают жидкие, полужидкие и плотные.

Синтетические питательные среды используют, когда выращиваемую клеточную массу необходимо максимально освободить от балластных органических соединений, входящих в состав обычных сред, например при получении диагностических аллергенов, или при изучении метаболических потребностей микроорганизма.

Требования, предъявляемые к питательным средам. Основные требования предъявляемые к питательным средам:

- 1) стерильность и по возможности прозрачность;
- 2) содержание необходимых для жизнедеятельности клеток питательных веществ, биохимических факторов – источников энергии, углерода, азота, серы, а также неорганических ионов – обязательно в форме, доступной для усвоения микроорганизмами;
- 3) оптимальные значения ряда биофизических показателей: концентрации водородных ионов (pH), окислительно-восстановительного потенциала (Eh), активности воды (a_w) осмотического давления.

Техника посева микроорганизмов. Микроорганизмы размножаются на питательных средах. Посев микробов осуществляют микробиологической петлей или иглой, и пастеровскими пипетками. Пипетки перед применением стерилизуют в паровом стерилизаторе, тонкие концы их запаивают. Внутрь широкого конца пипетки, с которым соприкасаются губы исследователя, вставляют кусочек стерильной ваты, препятствующей попаданию материала в ротовую полость.

Техника посева. Петлю или пипетку держат в правой руке, пробирку – в левой (рис. 8). Пробку мизинцем правой руки прижимают к ладони, и после извлечения держат в руке. Петлю вводят в пробирку, материал на плотной среде распределяют зигзагообразно, а в жидкой – вращательным движением. При пересеве из одной пробирки в другую петлю после введения внутрь охлаждают, затем берут культуру и извлекают из пробирки так, чтобы она не прошла над пламенем спиртовки.

Для посева уколом в пробирку с МПЖ столбиком необходимо иметь микробиологическую иглу, беспрепятственно проходящую в глубь питательной среды. На пути прохождения иглы остаются микробы, которые могут расти по уколу.

При посеве в бульонную культуру петлей касаются дна пробирки.

Пастеровскими пипетками берут жидкий материал или культуру, выращенную на жидкой питательной среде. Перед этим пипетку проводят над пламенем спиртовки, стерильным пинцетом отламывают запаянный конец, набирают материал и переносят на питательную среду. Пробирку закрывают над пламенем, а пипетку опускают в сосуд с дезинфицирующей жидкостью. На пробирках или чашках пишут дату, название органа или культуры, номер акта экспертизы, при проведении научных исследований делают другие пометки. Затем пробирки помещают в термостат для культивирования.

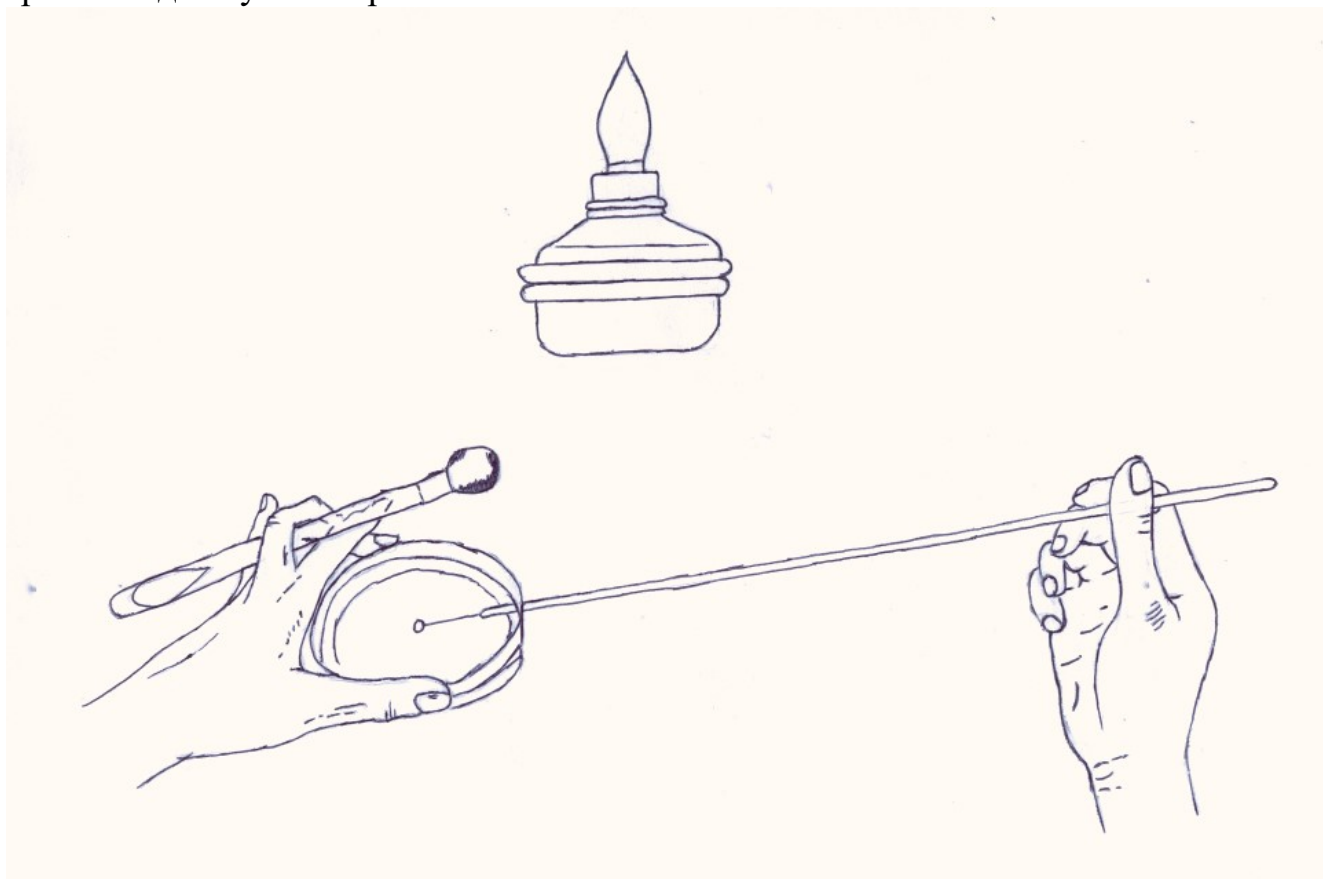


Рисунок 8 Посев в плотную питательную среду в чашки Петри

Методы культивирования микроорганизмов. Культивирование – выращивание микроорганизмов на специальных питательных средах. Культивирование проводят в лабораторных и производственных условиях с целью:

- количественного и качественного анализа микрофлоры различных объектов: пищевых продуктов, воды, воздуха и т.д.;
- изучения свойств микроорганизмов и их идентификации;
- выращивания полезных микроорганизмов (приготовление заквасок, получение продуктов микробиологического синтеза, ферментов, белка и т.д.).

Различают три вида культивирования микроорганизмов:

1. Периодическое – используется при получении заквасок; характерны закономерности статической культуры до фазы отмирания, включает стадии

выращивания, концентрирования клеток путем отделения от питательной среды сепарированием, сублимационной сушки, для которой используются специальные защитные среды.

2. Непрерывное – используется с целью продления фазы роста, для этого используют два способа – многократный пересев на новую питательную среду и непрерывное введение питательного раствора при одновременном удалении продуктов метаболизма и части бактериальной суспензии. Осуществляют в специальных аппаратах двух типов:

- хемостатах - рост микроорганизмов регулируется концентрацией лимитирующих веществ питательного субстрата – источников С, азота, витаминами, микроэлементами и т.п.);

- турбидостатах - процесс контролируется по изменению концентрации микроорганизмы путем измерения оптической плотности, мутности в прозрачных питательных средах.

3. Синхронное – одновременное деление клеток, применяется в научных целях для изучения циклов клеточного деления; нужны клетки одного возраста, этого добиваются путем изменения температуры, поступления кислорода, питательных веществ, использования бактериальных фильтров.

6 Контрольные вопросы:

- 6.1 Что такое питательные среды?
- 6.2 Как классифицируют питательные среды?
- 6.3 Какие среды относятся к основным?
- 6.4 Какие среды относятся к обогащенным?
- 6.5 Назовите дифференциально-диагностические среды.
- 6.6 Каким требованиям должны отвечать питательные среды?
- 6.7 В чем заключается техника посева на питательные среды?
- 6.8 Что такое культивирование микроорганизмов?
- 6.9 Какие различают виды культивирования микроорганизмов?

Лабораторная работа №6

КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ

1 Цель работы: Изучить характер роста микроорганизмов и их особенности на искусственных питательных средах.

2 Материалы и оборудование: питательные среды с ростом культур с предыдущего занятия, лупы, микроскопы, счетчик колоний.

3 Общие сведения. В процессе идентификации наряду с другими свойствами у микроорганизмов изучают культуральные (макроморфологические) признаки.

4 Порядок выполнения работы. Изучить характер роста микроорганизмов на искусственных питательных средах.

5 Задание

5.1 Изучить культуральные свойства микроорганизмов на жидких питательных средах;

5.2 Изучить культуральные свойства микроорганизмов на полужидких питательных средах;

5.3 Изучить культуральные свойства микроорганизмов на плотных питательных средах;

5.4 Провести подсчет колоний на плотных питательных средах с помощью счетчика колоний;

5.5 Приготовить мазки и определить форму микроорганизмов.

Культуральные свойства микроорганизмов – характер роста микроорганизмов на искусственных питательных средах. Культуральные признаки изучают на плотных, жидких и полужидких питательных средах.

Культуральные свойства микроорганизмов на плотных питательных средах. Микробы каждого вида формируют колонии с определенными признаками, которые обычно учитывают при идентификации. При описании колоний указывают возраст культуры, состав среды и температуру культивирования.

Колония микроорганизмов – изолированное скопление клеток одного вида, образующихся в результате деления одной микробной клетки, между которыми существуют связи за счет прилипания (когезии) или специальных образований – тяжей. Колонии очень разнообразны по форме, цвету, размерам и т.д.

При изучении культуральных признаков в первую очередь определяют наличие или отсутствие роста в питательной среде. Рост может быть обильным (сплошной рост), умеренным или скудным. Затем выбирают четко выраженную изолированную колонию (рисунок 9) и её изучают с подробным описанием. С обратной стороны чашки колонию обводят карандашом по стеклу.

У выделенных колоний определяют:

1) **Размеры колоний**, измеряют диаметр колонии линейкой в мм. Размеры могут быть точечные - диаметром до 1 мм, мелкие – 1-2 мм, средние – 2-5 мм, и крупные – более 5 мм.

2) **Форму колоний**. Она может быть округлой, овальной и неправильной (корневидной, амёбовидной и т. д.) формы.

3) *Края колонии* могут быть ровными и неровными (волнистыми, зазубренными, бахромчатыми, лопостеобразными, изрезанными и т.д.), их исследуют невооруженным глазом или под малым увеличением микроскопа.

4) *Поверхность колоний* может быть двух типов: R-типа – неровная, шероховатая, матовая, складчатая, сухая; S-типа – ровная, гладкая, блестящая, влажная.

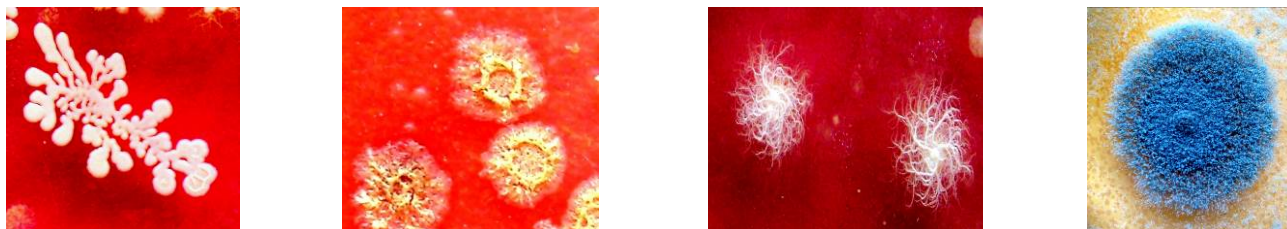


Рисунок 9 Колонии различных микробов на МПА

5) *Пигментацию колоний* определяют визуально. Микроорганизмы, не синтезирующие пигмент, формируют бесцветные колонии. Цвет колоний зависит от способности микроорганизма образовывать пигмент: белый, желтый, красный, сине-зеленый и т.д. Например, красный пигмент образует чудесная палочка (*Serratia marcescens*), сине-зеленый пигмент продуцирует синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*), желтый и золотисто-желтый - вырабатывают стафилококки, сарцины (*Sarcina flava*), черный и бурые пигменты вырабатывают некоторые грибы, азотобактер и другие микроорганизмы.

6) *Рельеф (профиль) колоний* – расположение колонии относительно питательной среды. Изучают рельеф колоний рассматривая её сбоку чашки Петри. Он может быть: плоским, плоско-выпуклым, выпуклым (конусообразным, куполообразным), плоским с конусовидным центром или углублением в центре колонии, с утолщенными (валикообразными) краями, вогнутым – колонии растут во внутрь питательной среды или в самой среде. Колонии некоторых видов вырастают в толщу питательной среды образуя глубинные (в виде чечевицы) или донные (в виде налетов на дне чашки) колонии.

7) *Консистенцию колоний* изучают, прикасаясь бактериальной петлей к поверхности колонии. Консистенция может быть слизистой – тянется за петлей, сухой – легко крошится, пастообразной, плотной и т.д.

8) *Прозрачность колонии* определяют визуально. Колонии могут быть непрозрачными, полупрозрачными, прозрачными.

9) *Структуру колоний*. Она может быть однородной, зернистой (мелко- или крупнозернистая), волокнистой и т.д. Ее выявляют при малом увеличении микроскопа или при помощи лупы.

10) *Запах*. Многие виды бактерий в процессе роста на питательных средах выделяют специфические вещества с неприятным запахом, также существуют микробы, выделяющие специфические ароматические вещества, с приятным запахом используемые в качестве заквасок, например в молочной промышленности.

Культуральные свойства в жидких питательных средах. В жидких средах определяют:

1) *Помутнение среды* - может отсутствовать; при наличии может быть обильным, умеренным и скудным.

2) *Поверхностный рост* может отсутствовать; при наличии может быть в виде поверхностной пленки и (или) пристеночного кольца

Поверхностная пленка может быть тонкой (нежной или грубой) или толстой (складчатой, морщинистой или гладкой).

Пристеночное кольцо образуется на внутренней поверхности пробирки, может быть хорошо или слабо выраженным, узким или широким.

3) *Осадок* может отсутствовать; при наличии может быть обильным, умеренным и скудным. При характеристике осадка пробирку слегка встряхивают и учитывают результат.

По характеру осадок может быть:

- хлопьевидным - при встряхивании образуются мелкие или крупные хлопья;
- слизистым - при встряхивании обычно поднимается в виде косички, ленты, нити;
- зернистым – при встряхивании образуются зерна или глыбки;
- рыхлым – в виде комочка ваты (облачка);
- однородным - при встряхивании может разбиваться в гомогенную равномерную суспензию.

4) *Цвет среды.* Пигментообразующие микроорганизмы вызывают окрашивание питательной среды (желтое, красное, сине-зеленое и т.д.).

5) *Газообразование* обнаруживают по наличию пузырьков, пены, а также с помощью газовок (маленькие пробирки Уленгута). Газовку предварительно помещают вверх дном в микробиологическую пробирку со средой перед стерилизацией и следят, чтобы она полностью была заполнена средой. При выделении газа он скапливается в газовке в виде пузырька и поднимается вверх в виде поплавка.

Культуральные свойства в полужидких питательных средах. В полужидкую питательную среду посев делают уколом бактериальной иглой, и следят за ростом по уколу. Аэробы, анаэробы и факультативные анаэробы имеют различный рост.

Аэробы – растут в верхней части пробирки в виде «перевернутой елочки».

Анаэробы – растут в нижней части пробирки в виде «правильной елочки».

Факультативные анаэробы – растут по уколу равномерно «ершиком».

6 Контрольные вопросы:

6.1 Что такое культуральные свойства микроорганизмов?

6.2 На каких питательных средах можно изучать культуральные свойства микроорганизмов?

Лабораторная работа №7

РУБЕЖНЫЙ КОНТРОЛЬ

1 Цель работы: закрепление полученных знаний на лабораторных занятиях

Повторите пройденный материал и ответьте на контрольные вопросы:

1. В чем заключается техника посева на питательные среды?
2. Как готовят препарат «Висячая капля»?
3. Как готовят препарат «Раздавленная капля»?
4. Как исследуют микроорганизмы на подвижность?
5. Как классифицируют питательные среды?
6. Как определить общую увеличивающую способность микроскопа?
7. Какие бывают методы фиксации мазка?
8. Какие группы шаровидных бактерий различают по их расположению?
9. Какие краски чаще применяются для окрашивания простым способом;
10. Какие морфологические группы имеются среди извитых форм?
11. Какие основные задачи выполняет бактериологическая лаборатория?
12. Какие различают бактериальные краски?
13. Какие различают виды культивирования микроорганизмов?
14. Какие различают сложные методы окрашивания?
15. Какие среды относятся к обогащенным?
16. Какие среды относятся к основным?
17. Какие существуют способы и цели фиксации.
18. Какие существуют способы окраски на споры и капсулы?
19. Какие формы микроорганизмов Вы знаете?
20. Каким требованиям должны отвечать питательные среды?
21. Какова методика окраски по Граму?
22. Какова цель фиксации мазка?
23. Каково назначение и правила работы с макро- и микрометрическими винтами микроскопа?
24. Методика приготовления мазка.

25. На каких питательных средах можно изучать культуральные свойства микроорганизмов?
26. На чем основано деление бактерий на собственно бактерии, бациллы и клостридии?
27. Назовите дифференциально-диагностические среды.
28. Назовите красители, применяемые в микробиологии.
29. Назовите основные принципы работы с иммерсионной системой
30. Повторите порядок приготовления мазка для бактериоскопии.
31. Порядок приготовления препарата для микроскопии.
32. Простой метод окраски.
33. С какой целью окрашивают по Цилю-Нильсену?
34. Способы обработки предметных и покровных стекол.
35. Что в себя включает механическая часть микроскопа?
36. Что в себя включает оптическая часть микроскопа?
37. Что такое капсула?
38. Что такое культивирование микроорганизмов?
39. Что такое культуральные свойства микроорганизмов?
40. Что такое питательные среды?
41. Что такое спора?

Лабораторная работа №8

МОРФОЛОГИЯ ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ И ДРОЖЖЕЙ

1 Цель работы: Изучить морфологические признаки микроскопических грибов и дрожжей; приготовить микропрепараты для микроскопии.

2 Материалы и оборудование: культуры микроскопических грибов и дрожжей, препаровальные иглы, бактериальные петли и иглы, микроскопы, предметные и покровные стекла, набор красок для простого способа окраски.

3 Общие сведения. Микроскопические грибы – это хемоорганотрофные* микроорганизмы, имеют многослойную клеточную стенку, цитоплазматическую мембрану, цитоплазму с органеллами и ядро с ядерной оболочкой (эукариоты). Относятся к царству Fungi (Mycetes, Mycota). Тело грибов организовано в виде мицелия (грибница), состоящего из сплетений тонких ветвящихся нитей – гиф. Они широко распространены в природе.

4 Порядок выполнения работы: Изучить рост микроскопических грибов на питательных средах и приготовить мазки.

5 Задание

5.1 Приготовить мазки из плесневых грибов методом «раздавленная капля»;

5.2 Приготовить мазки из культуры дрожжей методом «раздавленная капля»;;

5.3 Окрасить мазки простым способом;

5.4 Провести микроскопию окрашенных и неокрашенных препаратов.

Микроскопические грибы делят:

По способу размножения грибы делят на совершенные и несовершенные. Совершенные грибы размножаются половым и бесполом путём, несовершенные грибы размножаются бесполом петём.

По отношению к субстрату мицелий бывает воздушный и субстратный. Воздушный мицелий (поверхностный, возвышающийся над питательной средой) отвечает за бесполое размножение. Субстратный мицелий (погруженный, контактирующий с питательной средой) отвечает за питание грибов.

По окраске мицелий может быть бесцветный или окрашенный (черный, зеленый, синий, бурый и т.д.).

По строению мицелия различают низшие и высшие грибы. Гифы низших грибов не имеют перегородок (несептированные), гифы высших грибов многоклеточные (септированные).

От мицелия отрастают воздушные гифы — спорангиеносцы или конидиеносцы. У некоторых микроскопических грибов мицелий отсутствует, например, дрожжи – немицелиальные грибы, или развит слабо.

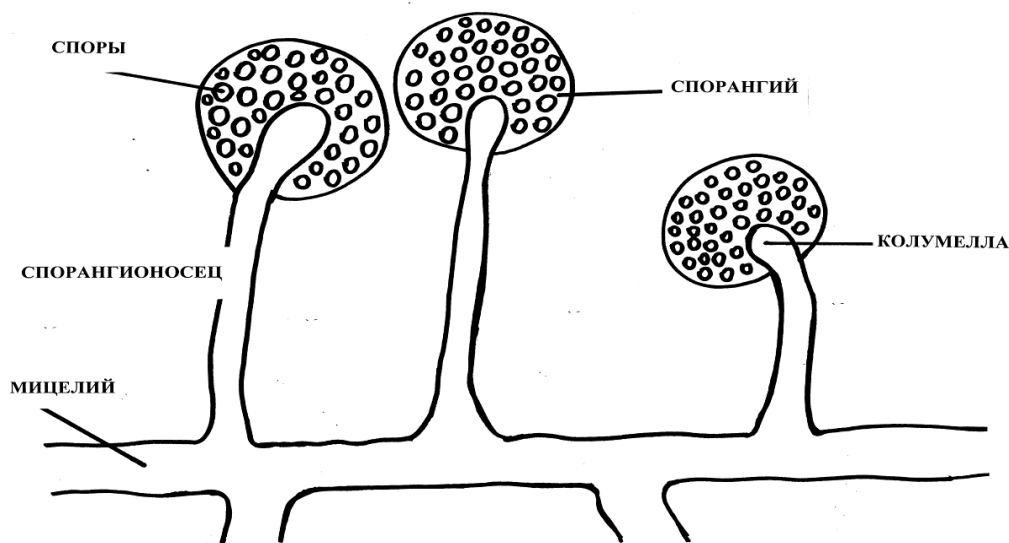


Рисунок 10 Схема строения грибов из рода *Mucor*

Низшие грибы (фикомицеты) имеют хорошо развитый ветвистый одноклеточный мицелий, размножаются бесполом путем спорангиеспорами (эндоспоры). Представителем являются грибы из рода *Mucor* (Мукоровые грибы, рисунок 10). Они имеют одноклеточный несептированный ветвистый мицелий, от которого отходит плодоносящий гиф — спорангиеносец. На конце гифа образуется закруглённое цилиндрическое утолщение – колумелла. На ней находится спорангий со спорами (эндоспоры или спорангиеспоры). На спорангиеносце после освобождения спорангия от спор остается колонка, а в нижней ее части — воротник.

Мукоровые грибы распространены в воздухе и почве, растут на влажных зернах, кормах, стенках сырых помещений в виде сероватого пушистого налета, могут вызывать мукоромикоз лёгких, головного мозга и других органов.

Высшие грибы (микомицеты, аскомицеты, сумчатые грибы, аск - сумка) имеют многоклеточный септированный мицелий (разделен поперечными перегородками), образуют споры в сумках – асках. Представителями являются микроскопические грибы из родов *Penicillium*, *Aspergillus* и др.

Род *Penicillium* (Пеницилловые грибы, кистевики, рисунок 11) - имеют бесцветный ветвистый септированный мицелий (толщина нитей 2 - 3 мкм), от которого отходят плодоносящие гифы - септированные конидиеносцы. На конце конидиеносцы разветвляются и образуют стеригмы. От них отходят расположенные в виде цепочек конидии, имеющие гладкую шаровидную форму. Расположение конидий на стеригмах напоминает кисть руки, поэтому эти грибы иногда называют кистевиками. У разных видов грибов споры неодинакового цвета — белые, зеленые и др. Сначала над субстратом вырастают белые, расходящиеся от центра нити, которые, разрастаясь, образуют отдельные колонии. Перед прорастанием конидии значительно увеличиваются в объеме.

Пеницилловые грибы выделяют токсичные вещества, которые могут приводить к воспалительным процессам и некрозам.

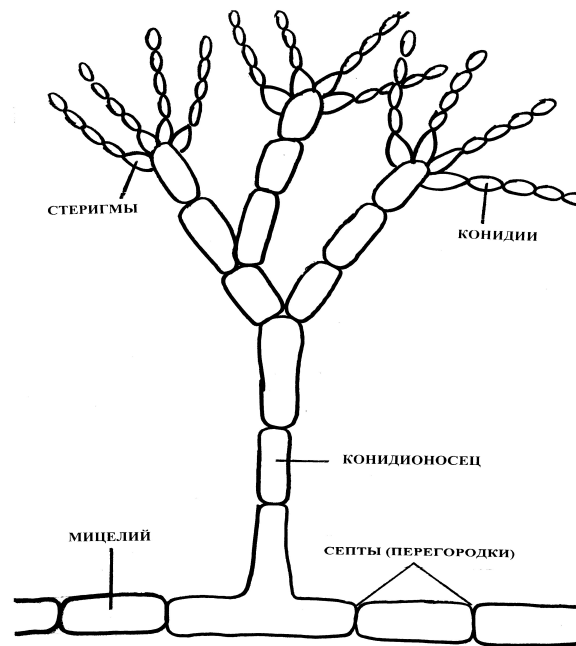


Рисунок 11 Схема строения грибов из рода *Penicillium*

Род *Aspergillus* (Аспергилловые грибы, леечные грибы, леечная плесень, рисунок 12) – имеют ветвистый многоклеточный септированный мицелий, от которого отходят плодоносящие гифы – септированные конидиеносцы (у некоторых видов не септированы). На вершине конидиеносцы расширяются, образуя булавовидное или шаровидное вздутие с расположенными по радиусу стеригмами. От них отходят расположенные в виде цепочек конидии. Конидии по своему расположению напоминают наконечник лейки со струёй воды, выливающейся из лейки, поэтому эти грибы иногда называют леечной плесенью. У разных видов грибов конидии окрашены различно (черные, светло-зеленные и др.), например, *Aspergillus oryzae* имеет конидии, окрашенные в желтый или желто-зеленый цвет, и часто покрыты тонкими щетинками.

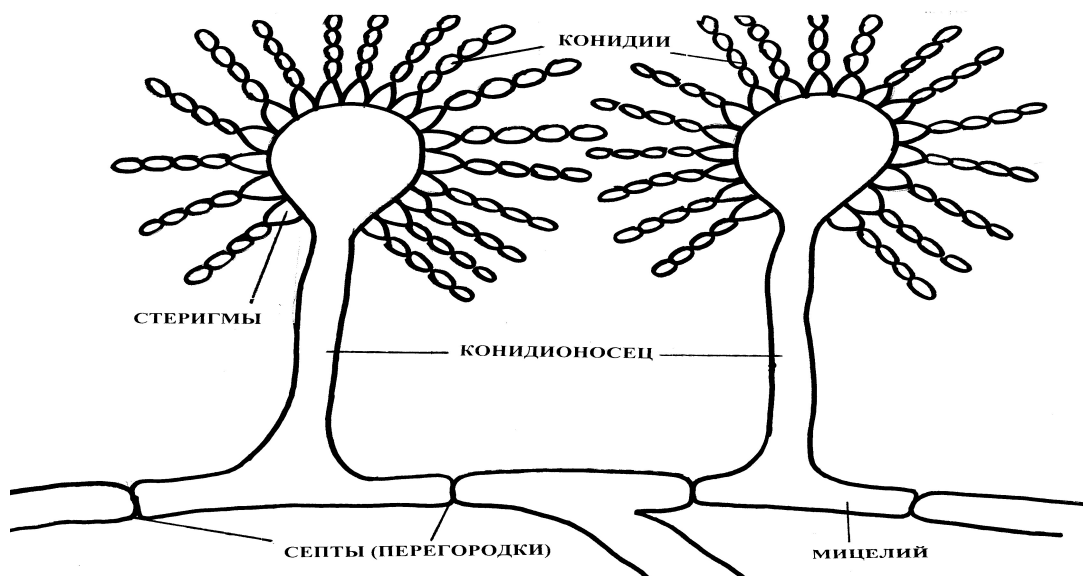


Рисунок 12 Схема строения грибов из рода *Aspergillus*

Аспергилловые грибы принимают участие в минерализации органических веществ. Эти грибы содержат ряд ферментов — амилазу, пектиназу, протеолитические ферменты и др.

Дрожжи - одноклеточные немиецелиальные грибы — эукариоты, имеют разнообразную форму: шаровидную, цилиндрическую, грушевидную, лимоновидную, яйцевидную. Размножаются почкованием и делением, поэтому различают почкующиеся и делящиеся дрожжи. Размер дрожжевых клеток больше бактериальных и достигает в диаметре 8 - 10 мкм. Дрожжевые клетки неподвижны и имеют клеточную стенку, цитоплазму и ярко выраженное дифференцированное ядро. У зрелых дрожжей обнаруживаются 1-2 вакуоли различной формы. В цитоплазме имеются разные включения: гликоген, капли жира. В некоторых дрожжевых клетках может накапливаться до 30 - 35 % жира. При спорообразовании в дрожжевой клетке образуется от 2 до 10 спор. Дрожжевая клетка в этом случае рассматривается как аск (сумка), а споры — как аскоспоры.

Дрожжи микроскопируют с помощью препарата «раздавленная капля». Также готовят мазки и окрашивают простым способом, по Граму или Романовскому-Гимзе. Плесневые грибы и дрожжи окрашиваются грамположительно (Gr⁺).

Приготовление препаратов микроскопических грибов. Микроскопические грибы исследуют в неокрашенном состоянии с помощью препарата «раздавленная капля». Для приготовления мазка из плотных питательных сред необходима жидкая смесь, состоящая из воды, этанола и глицерина в равных объемах.

Порядок приготовления препарата:

- 1) Берут чистое предметное стекло.
- 2) Наносят каплю жидкой смеси состоящей из воды, глицерина и этанола в равных частях или каплю дистиллированной воды.
- 3) Фламбированной иглой берут кусочек мицелия, помещают в каплю жидкости и расправляют.
- 4) Накрывают покровным стеклом.
- 5) Микроскопируют под увеличением $\times 40$, в затемненном поле зрения.

При микроскопировании низших грибов выявить одноклеточное строение мицелия, спорангионосец и органы размножения — спорангий со спорами. Рассмотреть их под микроскопом при увеличении объектива $\times 40$ по всей длине, передвигая соответствующим образом препарат. В препарате всегда отмечается большое количество свободнолежащих спор, высыпавшихся из лопнувших спорангиев.

При микроскопировании высших грибов установить многоклеточные (септированные) гифы и органы размножения — конидионосцы с кистевидными разветвлениями на концах, на которых расположены стеригмы (по 2 - 4) с цепочками одноклеточных конидий.

*Хемоорганотрофы — организмы, для которых источником энергии служат окислительно-восстановительные реакции, а донором электронов (источником питания) — органические вещества.

6 Контрольные вопросы:

- 6.1 Морфология микроскопических грибов из рода *Mucor*.
- 6.2 Морфология микроскопических грибов из рода *Aspergillus*.
- 6.3 Морфология микроскопических грибов из рода *Penicillium*.

Лабораторная работа № 9

МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ

1 Цель работы: Изучить способы подготовки посуды к стерилизации и разные методы стерилизации.

2 Материалы и оборудование: стерилизаторы, посуда для стерилизации.

3 Общие сведения. Подготовка посуды для стерилизации. Лабораторная посуда должна быть чисто вымытой и простерилизованной. Для мытья используют растворы мыла или химические моющие средства. Новую посуду предварительно кипятят в 1-2%-м растворе соляной кислоты. Вымытую в проточной воде посуду ополаскивают дистиллированной водой и высушивают.

Бактериологические пробирки, конические, матровые колбы закрывают ватно-марлевыми пробками. Следует учитывать, что стерилизация ватных пробок при высокой температуре приводит к выделению из ваты веществ, ингибирующих рост некоторых чувствительных бактерий, например бруцелл.

При монтаже мерных пипеток, пипеток Пастера в верхний конец вставляют ватный тампон. У пипеток Пастера должен быть запаян капилляр. Каждую мерную пипетку заворачивают длинной полоской бумаги шириной 4-5 см, начиная с носика, винтообразно, по всей длине. Пипетки Пастера заворачивают в бумагу по 10-20 штук, пробирки – по 15-20 штук. Все виды пипеток лучше хранить до и после стерилизации в специальных металлических пеналах. Пробки на колбах дополнительно покрывают колпачками из бумаги.

Чистые чашки Петри в собранном виде перед стерилизацией заворачивают в бумагу по 3-4 штуки. После стерилизации бумага предохраняет стерильную посуду от загрязнения микрофлорой.

4 Порядок выполнения работы: Изучить методы стерилизации и подготовить посуду для стерилизации.

5 Задание

5.1 Изучить, что такое стерилизация и какие бывают методы стерилизации;

5.2 Подготовить посуду для стерилизации;

5.3 Провести стерилизацию.

Стерилизация (лат. sterilis – бесплодный, обеспложивание) - это уничтожение в каком-либо материале патогенных и непатогенных микроорганизмов в вегетативной и споровой формах.

Различают физические, механические, химические и биологические методы стерилизации. Механизмы их действия неодинаковы, но при выборе любого из методов должны быть соблюдены два основных требования: достижение полного обеспложивания и сохранение физико-химических свойств стерилизуемого материала.

Физические методы стерилизации. Методы заключаются в уничтожении микроорганизмов с помощью физических средств. К ним относят: стерилизацию сухим жаром и влажным паром. Различают полную и неполную стерилизации. Полная стерилизация – уничтожение вегетативных и споровых форм микроорганизмов. Неполная стерилизация – уничтожение только вегетативных форм микроорганизмов.

Стерилизация сухим жаром - действие высокой температуры в виде сухого нагретого воздуха. Гибель клеток бактерий, грибов, дрожжей и вирусных частиц происходит в результате сгорания клеток или в результате коагуляции белковых структур микроорганизмов. К ним относят:

Фламбирование или прокалывание (фр. flamber — пылать, пламенеть) – стерилизация над пламенем огня. Этим методом стерилизуют обычно металлические предметы: бактериологические петли, пинцеты, препаровальные иглы, ножницы, предметные стёкла и др. Это полная стерилизация.

Стерилизация сухим жаром в печах Пастера. Печь Пастера – специальный сушильный шкаф с двойными стенками облицованный снаружи теплонепроницаемым материалом. В его верхней части находится термометр. Между теплонепроницаемой обшивкой и внутренним металлическим корпусом на дне помещен автоматический электронагревательный элемент. При включении электрошкафа в электросеть воздух внутри него нагревается. По достижении заданной температуры отмечают время начала стерилизации.

Режим стерилизации: при температуре 155-160°C – выдерживают 2ч; при 165-170°C – 1-1,5ч; при 180°C – 1ч. По истечении времени стерилизации нагревание прекращают, и лишь когда температура снизится примерно до 45°C шкаф открывают. Это полная стерилизация. Нельзя стерилизовать жидкости, легковоспламеняющиеся вещества, питательные среды, резиновые предметы, в основном применяют для стерилизации чистой стеклянной и металлической посуды и инструментов.

Стерилизация влажным паром – действие высокой температуры в виде горячего пара. Включает в себя следующие методы:

Кипячение – проводят в стерилизаторах – специальные металлические ванночки с крышкой и вставной решеткой – подставкой. Стерилизуют металлические инструменты (иглы, пинцеты, ножницы, скальпели и др.), некоторые резиновые и стеклянные предметы (шприцы).

Подставку выстилают двумя-тремя слоями марли или тонким слоем гигроскопической ваты. Шприцы стерилизуют в разобранном виде, в иглы вставляют мандрены. Режущие инструменты – лезвия скальпелей, ножниц обертывают марлей или ватой. В стерилизатор наливают воду (лучше стерилизованную – дистиллированную или дважды кипяченую) так, чтобы она полностью покрывала инструменты, и добавляют 2%-й раствор гидрокарбоната натрия. Стерилизатор закрывают крышкой.

Режим стерилизации: температура 100°C, кипятят от 20-30 до 60 мин. После стерилизации воду осторожно сливают, а инструменты используют только после их охлаждения. Дистиллированную воду или приготовленный физраствор стерилизуют на небольшом огне в колбе.

Стерилизация текущим паром в аппарате Коха. Аппарат Коха – одностенный металлический котел цилиндрической формы с двойным дном и крышкой с отверстиями для термометра и выхода пара. На дно аппарата наливают воду до уровня, о котором судят по показанию водомерной трубки. Началом стерилизации считают момент закипания воды. Образующийся пар устремляется вверх непрерывной струей, соприкасаясь с обрабатываемым материалом.

Режим стерилизации: стерилизуют при температуре 100°C 30-40 мин. три дня подряд. Однократное прогревание убивает только вегетативные формы микроорганизмов. Оставшиеся жизнеспособными споры в периоды между стерилизацией прорастают в вегетативные формы. Стерилизация на следующий день вызывает их гибель. На третий день прогревание гарантирует полное обеспложивание материала. Эффективность дробной стерилизации зависит от прорастания спор, а поэтому в промежутках между нагреванием материалы выдерживают при комнатной температуре (оптимум 25°C). Это полная дробная стерилизация.

Тиндализация. Это дробная стерилизация при температурах ниже 100°C, которую проводят в водяной бане. Метод разработал в 1877 г. английский физик Джон Тиндаль (1820 – 1893), рисунок 13. Этим методом стерилизуют питательные среды, сыворотку крови, коллоидные растворы и другие материалы и вещества (желатина, углеводы), которые разрушаются при нагревании их свыше 100°C. Коллоидные растворы, сыворотку крови, а также белоксодержащие вещества стерилизуют тиндализацией при 56-58°C, так как они разрушаются при более высокой температуре.

Режим стерилизации: кратность прогрева зависит от температуры: при 56-58°C – 6-7 дней, 60-65°C – 5 дней, 70-80°C – 3 дня. В первый день материалы стерилизуют 2ч, в последующие дни по 1ч. В промежутках между прогреваниями стерилизуемый материал выдерживают при комнатной температуре для прорастания спор. Однократное прогревание убивает только вегетативные формы микроорганизмов. Оставшиеся жизнеспособными споры бацилл в периоды между стерилизацией прорастают в вегетативные формы. Стерилизация на следующий день вызывает их гибель. На третий день прогревание гарантирует полное обеспложивание материала.

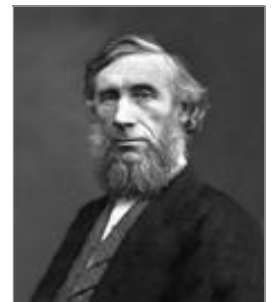


Рисунок 13
Джон Тиндаль
(1820 – 1893)

Эффективность дробной стерилизации зависит от прорастания спор, а поэтому в промежутках между нагреванием материалы выдерживают при комнатной температуре (оптимум 25°C). Это полная дробная стерилизация.

Автоклавирование - стерилизация паром под давлением при высокой температуре в специальном аппарате – автоклаве (рисунок 14).

Вертикальный автоклав – это двустенный металлический котел цилиндрической формы, закрываемый герметично крышкой. Между стенками через специальный кран с воронкой заливают воду до определенного уровня. Внутренняя стенка котла в верхней части снабжена отверстиями, в нижней части котла – краном, через который при нагревании воды пар вытесняет воздух из котла. Автоклавирование проводит специально подготовленный специалист, так как работа по обслуживанию аппарата, работающего под давлением требует подготовки и строгого соблюдения правил техники безопасности.



Рисунок 14
Автоклав ВК-30

Автоклав загружают стерилизуемым материалом, закрывают крышку и кран, через который заливали воду, нижний кран временно оставляют открытым. Нагреваемая вода между стенками автоклава кипит, образующийся пар поднимается вверх и через верхние отверстия внутренней стенки проходит внутрь котла, толчками вытесняя воздух через нижний открытый кран. Когда воздух весь вытеснен и пар начинает выходить ровной струей, нижний кран закрывают. В результате давление пара внутри автоклава повышается. Началом стерилизации считают момент, когда давление достигает заданной величины (судят по показаниям манометра). Нагрев регулируют на протяжении всей стерилизации, поддерживая давление пара на одном уровне. При чрезмерном повышении давления внутри автоклава предусмотрен предохранительный клапан, через который избыток пара автоматически выходит наружу. При повышении давления пара повышается и температура в автоклаве.

Режим стерилизации: давление	0,5 атм	температура	110-112°C;
	1 атм		120-121°C;
	1,5 атм		124-126°C;
	2 атм		133-135°C.

При таких режимах автоклавирования вегетативные формы микроорганизмов погибают в течение нескольких минут, а споры в течение 20-30 мин. Режим стерилизации выбирают в зависимости от свойств стерилизуемого материала. Манометр показывает давление пара без учета окружающего атмосферного давления (760 мм рт. ст.). По истечении времени стерилизации автоклав отключают. При нулевом показании манометра открывают кран для спуска пара. Крышку открывают осторожно на себя, не заглядывая в котел, оберегая лицо и глаза от возможного остаточного пара. До полного выхода пара открывать крышку нельзя, так как при быстром падении давления внутри автоклава стерилизуемые жидкие среды закипают и выталкивают из пробирок пробки вместе с жидкостью.

Автоклавированием стерилизуют питательные среды, выдерживающие нагревание выше 100°C (МПА, МПБ), физиологический раствор, стеклянную посуду, завернутую в бумагу, перевязочный материал и спецодежду, сложенные в металлические боксы; обеззараживают использованные бактериальные культуры. Это полная стерилизация.

Эффективность стерилизации проверяют высевом спорного материала, который предварительно выдерживают в автоклаве вместе со стерилизуемыми объектами. После инкубирования в термостате в течение нескольких дней среды должны остаться стерильными.

Пастеризация – применяется для стерилизации пищевых продуктов с целью сохранения их питательной ценности.

Этот метод предложил Луи Пастер (рис. 15) для сохранения питательной ценности пищевых продуктов (молоко, мясные, рыбные и овощные консервы), которая снижается при кипячении (разрушаются витамины и некоторые другие вещества). При пастеризации продукт нагревают до 80-90°C 30 мин, затем резко охлаждают (до 4-8°C). Крупные предприятия (молокозаводы) оснащены специальными пастеризаторами с охлаждающей системой. Пастеризация снижает количество бактерии: погибают вегетативные формы, а споры сохраняются. Резкое охлаждение и последующее хранение при низкой температуре (4-5°C) препятствуют прорастанию спор и последующему размножению бактерий.

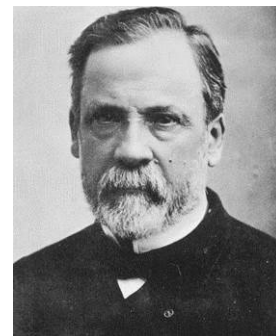


Рисунок 15
Луи Пастер
(1822 - 1895)

Существует три режима пастеризации: длительная – при температуре 63-65°C в течение 20-30 минут, кратковременная – при 75°C от нескольких секунд до 5 минут, моментальная – при 90-93°C без выдержки.

Механические методы стерилизации. Методы заключаются в уничтожении микроорганизмов с помощью механических, задерживающих факторов. К ним относят фильтрование, стерилизацию ультрафиолетовыми лучами, ультразвуком.

Стерилизация фильтрованием – метод, с помощью которого обычно стерилизуют жидкости, не выдерживающие нагревания (сыворотки крови, растворы антибиотиков и др.), синтетические среды определенного состава, содержащие термолабильные аминокислоты, витамины, белки, ароматические углеводороды. Жидкости пропускают через бактериальные мелкопористые фильтры, которые адсорбируют клетки микроорганизмов: каолин, асбест, фарфор и др. Фильтрование происходит за счет перепада давления, вызванного либо приложением повышенного давления к жидкости, находящейся над фильтром, либо созданием вакуума в приемнике фильтра. Действие фильтра состоит в механической задержке и адсорбции микроорганизмов стенками пор фильтра. Однако следует помнить, что размеры микроорганизмов бывают меньше среднего диаметра пор фильтров. Фильтры выпускают керамические, асбестовые – в виде пластинок, мембранные – с наиболее точной калибровкой пор.

Керамические фильтры (Шамберляна, Беркеефльда) производят из смеси каолина и кварцевого песка.

Асбестовые фильтры (Зейтца) – плотные пластины, изготовленные из смеси асбеста с целлюлозой. Отечественные асбестовые фильтры обозначают марками Φ_2 и СФ. К стерилизующим относят фильтры марки СФ.

Мембранные фильтры (коллоидные мембраны, ультрафильтры) представляют собой тончайшие листки из обработанной определенным образом нитроцеллюлозы. Фильтры выпускают с порами различного диаметра (от 0,22 до 100 нм). Применяют для фильтрации, концентрации веществ, содержащихся в фильтруемом материале, а также для определения размеров микроорганизмов.

Большей частью в работе используют фильтры Зейтца и мембранные фильтры. Фильтры монтируют в специальный держатель – воронку, который вставляют в пробку колбы Бунзена (толстостенная колба с тубусом). Смонтированный фильтр обертывают бумагой и стерилизуют в автоклаве.

Фильтруемую жидкость наливают в воронку над фильтром, на тубус колбы надевают резиновую трубку (шланг), присоединенную к ручному или электрическому насосу, выкачиванием воздуха из колбы создают пониженное давление и фильтруют жидкость. Бактерии остаются на фильтре. Стерильность полученных фильтратов проверяют посевом на питательные среды с последующим инкубированием в термостате в течение нескольких дней.

Стерилизация ультрафиолетовыми лучами – метод, применяемый для обеззараживания воздуха в помещениях (боксах, операционных). В лаборатории источником УФ-лучей обычно служат специальные бактерицидные лампы. Бактерицидные лампы также нашли применение в пищевой промышленности при хранении различных продуктов (температура выше 0°C).

Стерилизация ультразвуком – метод, который используют для обеззараживания воды, молока, некоторых продуктов, а также кожевенного сырья. Стерилизующее действие ультразвука связано с возникновением в цитоплазме бактерий кавитационных пузырьков, заполненных парами под давлением около 10 тыс. атм., вследствие чего разрушаются внутренние структуры бактериальной клетки.

Химические методы стерилизации. Сводятся в лабораторной практике к консервированию питательных сред, вакцин, а также лечебных и диагностических сывороток различными химическими соединениями (соли металлов, щелочи, антибиотики и др.) с целью предупреждения бактериального загрязнения. Питательные среды консервируют хлороформом, толуолом, иногда эфиром (для освобождения от консерванта среду нагревают до 56°C). Вакцины и лечебные сыворотки консервируют 0,25-0,5%-м раствором фенола, 0,5%-м раствором хлороформа, 0,5%-м раствором формалина или раствором мертиолат (в конечном разведении 1:5000 – 1:10000). Для консервирования агглютинирующих сывороток используют борную кислоту, толуол, глицерин.

Биологические методы стерилизации. Применяются в вирусологии для стерилизации живых культур клеток. Стерилизацию проводят с помощью антибиотиков: пенициллин, стрептомицин, нистатин и т.д. Микроорганизмы под действием антибиотиков погибают, а вирусы остаются живыми.

6 Контрольные вопросы:

- 6.1 Что такое стерилизация?
- 6.2 Какие требования предъявляют к стерилизации?
- 6.3 Устройство и назначение автоклава.
- 6.4 Как контролируют качество работы автоклава?
- 6.5 На чем основан метод стерилизации текучим паром?

Лабораторная работа №10

МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ВОДЫ И ВОЗДУХА

1 Цель работы: Изучить методы санитарно-микробиологического контроля воды и воздуха.

2 Материалы и оборудование: колбы, пробирки, спиртовки, питательные среды, термостат, спички.

3 Общие сведения. Основные задачи санитарно-микробиологических исследований состоят в том, чтобы определить состояние того или иного объекта как возможного источника инфицирования людей, животных (в том числе птиц, рыб).

4 Порядок выполнения работы

Санитарно-бактериологическое исследование воды. Отбор проб воды из крана проводят согласно ГОСТ.

При отборе проб для определения микробиологических показателей металлические краны предварительно стерилизуют путем обжига (фламбируют), а пластмассовые краны очищают, дезинфицируют и многократно ополаскивают исследуемой водой. Производят спуск воды продолжительностью не менее 10 минут при полностью открытом кране. При отборе пробы напор воды уменьшают. Из крана водопровода пробу берут в стерильные стеклянные емкости с широким горлом вместимостью не менее 300 см³ с плотно закрывающимися пробками. Допускается использовать одноразовые стерильные емкости. Емкость открывают непосредственно перед отбором пробы, избегая загрязнения горловины емкости и пробки. Ополаскивать емкости не допускается. Хлорированную воду перед исследованием нейтрализуют серноватистокислым натрием (гипосульфит натрия) в виде кристаллов или концентрированного раствора из расчета 10 мг на 0,5 л воды. После заполнения емкость закрывают стерильной пробкой и колпачком. При заполнении емкостей должно оставаться пространство между пробкой и поверхностью воды, чтобы пробка не смачивалась при транспортировании. Промежуток времени с момента взятия пробы до бактериологического исследования не должен превышать 2 ч (при транспортировании в контейнерах-холодильниках при температуре 4-10°C не должен превышать 6 ч). При отборе проб составляют акт об отборе проб (приложение А).

Определение общего количества бактерий в 1 см³ воды (КОЕ). Перед посевом пробу тщательно перемешивают, край емкости фламбируют. Используемые пробирки и чашки маркируют.

Этот метод позволяет определить в питьевой воде общее микробное число (ОМЧ) мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФАНМ), способных образовывать колонии на питательном агаре при температуре 37°C в течении 24 ч.

Из исследуемой пробы берут по 1 мл и вносят в 2 стерильные чашки Петри, слегка приоткрывая крышку. Заливают 8-12 мл расплавленным МПА (45-49°C) после фламбирования края посуды, в которой он содержится. Осторожным вращением чашки, равномерно перемешивают смесь по всему дну, избегая

образования пузырьков воздуха и попадания агара на края и крышку чашки. Чашки помещают в термостат вверх дном при $t^{\circ} 37^{\circ}\text{C}$ на 24 ч.

Подсчитывают все выросшие колонии через лупу (увеличение в 2 раза). Количество колоний на обеих чашках суммируют и делят на два. Результат выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл исследуемой пробы воды.

Общее количество микроорганизмов (КОЕ) в 1 мл водопроводной воды не должно превышать 50, а открытых водоемов — не более 1000.

Санитарно-бактериологическое исследование воздуха. Для санитарной оценки воздуха животноводческих и других помещений определяют общее количество микроорганизмов в 1 м^3 , применяя один из следующих методов.

Седиментационный метод Коха — наиболее простой, но наименее точный, основан на оседании микробов. В помещении ставят открытую чашку Петри со стерильным МПА на 20—30 мин, закрывают крышкой и ставят в термостат при 37° на 48 ч (в рабочей тетради отмечают место и время взятия пробы воздуха). Затем ведут подсчет колоний в чашке и вычисляют количество бактерий в 1 м^3 по формуле Омелянского:

$$X = \frac{A \times 100 \times 5}{B \times 10 \times v} \times 1000,$$

где X — количество бактерий в 1 м^3 ; A — количество колоний на МПА в чашке; B — площадь чашки; 100, 5, 10 — экспериментально установленные Омелянским числовые показатели (на площади в 100 см^2 за 5 мин оседают микробы из 10 л воздуха); v — время, в течение которого взята проба воздуха; 1000 — пересчет на 1 м^3 воздуха.

Метод Коха не дает точных показателей количественного содержания микробов в воздухе, т.к. на открытых чашках оседают главным образом крупные пылевые частицы и плохо улавливаются тонкодисперсные фракции бактериальных капель и пылевых частиц, содержащих в себе микробы. В связи с этим метод Коха используют только при исследовании воздуха закрытых помещений.

5 Задание.

5.1 Провести контроль водопроводной воды

5.2 Провести контроль микрофлоры воздуха учебных аудиторий.

6 Контрольные вопросы:

6.1 Как проводят санитарно-бактериологический контроль воды?

6.1 Сколько колоний допускается в 1 мл воды?

6.3 Как проводят санитарно-бактериологический контроль воздуха?

Лабораторная работа №11

МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ МОЛОКА

1 Цель работы: Изучить методы микробиологического контроля сырого и питьевого молока.

2 Материалы и оборудование: пробы сырого и питьевого молока в колбах, индикаторы для определения качества сырого и питьевого молока, колбы, пробирки, пипетки, водяная баня или термостат.

3 Общие сведения.

Сырое молоко - молоко, не подвергавшееся термической обработке при температуре более 40°C или обработке, в результате которой изменяются его составные части (ГОСТ 31449-2013 Молоко коровье сырое. Технические условия).

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

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

Методы микробиологического анализа проводят согласно ГОСТ.

4 Порядок выполнения работы.

Метод определения уровня бактериальной обсемененности сырого молока – редуктазная проба (ГОСТ 32901-2014 Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа).

Редуктазная проба – метод оценки уровня бактериальной обсемененности сырого молока, основанный на восстановлении индикатора резазурина окислительно-восстановительными ферментами, выделяемыми микроорганизмами.

Метод основан на восстановлении резазурина* окислительно-восстановительными ферментами**, выделяемыми в молоко микроорганизмами. По продолжительности изменения окраски резазурина оценивают бактериальную обсемененность сырого молока.

Пробу с резазурином следует проводить не ранее чем через 2 ч после доения.

В обычные микробиологические пробирки наливают по 1 см³ рабочего раствора резазурина*** и по 10 см³ исследуемого молока, закрывают резиновыми пробками и смешивают путем медленного трехкратного переворачивания пробирок. Пробирки помещают в редуктазник с температурой воды (37±1)°C.

При отсутствии редуктазника можно использовать водяную баню, помещенную в термостат с температурой (37±1)°C.

Вода в редуктазнике или водяной бане после погружения пробирок с молоком должна доходить до уровня жидкости в пробирке или быть немного выше, температуру (37±1)°C поддерживают в течение всего времени определения.

Пробирки с сырым молоком и резазурином на протяжении анализа должны быть защищены от света прямых солнечных лучей (редуктазник должен быть плотно закрыт крышкой).

Время погружения пробирок в редуктазник считается началом анализа.

По истечении 1 ч пробирки вынимают из редуктазника и снимают показатели. Появление окрашивания молока в этих пробирках при встряхивании не учитывают.

Пробирки с молоком, имеющим окраску от серо-сиреневой до сиреневой со слабым серым оттенком, оставляют в редуктазнике ещё на 30 минут.

Учет реакции. В зависимости от продолжительности обесцвечивания или изменения цвета молоко относят к одному из классов, указанных в таблице 1.

*Резазурин – окислительно-восстановительный индикатор синего цвета, который при окислении превращается в розовый флуоресцирующий резорурфин. Рабочий раствор резазурина хранят не более 7 суток при температуре 3-10°C, в банках из темного стекла. При помощи резазурина определяют не только число микробов, но и лейкоцитов в молоке.

Таблица 1 - Редуктазная проба

Класс молока	Продолжительность обесцвечивания или изменения цвета, ч	Окраска молока	Ориентировочное количество бактерий в 1 см ³ молока, КОЕ
I	Через 1 час	от серо-сиреневой до сиреневой со слабым серым оттенком	До 500 тыс.
II	Через 1 час	Сиреневая с розовым оттенком или ярко-розовая	От 500 тыс. до 4 млн.

Примечания

1 Пробы сырого молока через 1,5 ч. выдержки с окраской от серо-сиреневой до сиреневой со слабым серым оттенком имеют ориентировочную бактериальную обсемененность менее 300 тыс.

2 Пробы сырого молока через 1 ч. выдержки с окраской от бледно-розовой до белой имеют ориентировочную бактериальную обсемененность более 4 млн.

**Редуктаза (анаэробные дегидразы) – фермент, вырабатываемый микроорганизмами. Следовательно, чем больше микробов в молоке, тем больше этого фермента. Редуктаза обладает способностью восстанавливать молоко окрашенное резазурином.

***Рабочий раствор резазурина – Вначале готовят основной раствор резазурина, а из основного раствора готовят рабочий раствор резазурина. *Основной раствор* резазурино-натриевой соли: берут 0,1г резазурино-натриевой соли, помещают в мерную колбу объемом 200 см³, добавляют небольшое количество прокипяченной и охлажденной до 25°C дистиллированной воды, перемешивают и доливают прокипяченной и охлажденной до 25°C дистиллированной воды до метки 200 см³. Смесь тщательно перемешивают. Срок хранения в темных склянках, в защищенном от света месте при температуре от 4°C до 10°C не более 30 суток. *Рабочий раствор* резазурино-натриевой соли готовят разбавлением основного раствора прокипяченной и охлажденной до 25°C дистиллированной воды в соотношении 1:2,5. Берут 10 см³ основного раствора и добавляют 25 см³

дистиллированной воды. Срок хранения в темных склянках, в защищенном от света месте при температуре $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ – не более 3 суток.

Определение КМАФАнМ (ГОСТ 32901-2014 Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа). - количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

Метод основан на подсчете колоний мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, вырастающих на плотной среде КМАФАнМ при температуре $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 72 ч.

Для определения КМАФАнМ выбирают те разведения, при посевах которых на чашках вырастает от 15 до 300 колоний. Пробы сырого молока засевают в разведении $0,001\text{см}^3$, $0,0001\text{см}^3$, $0,00001\text{см}^3$. Каждое из разведение должно быть засеяно в количестве 1 см^3 в одну чашку Петри с заранее маркированной крышкой и залито $14\pm 1\text{ см}^3$ расплавленной и охлажденной до температуры 40°C - 45°C питательной средой для определения КМАФАнМ.

Допускается посев исследуемого продукта на чашки Петри из одного и того же разведения в количестве 1см^3 и $0,1\text{см}^3$.

Сразу после заливки агара содержимое чашки Петри тщательно перемешивают путем легкого вращательного покачивания для равномерного распределения посевного материала.

Допускается проведение двух параллельных определений, то есть проведение посева каждого разведения на две чашки Петри.

После застывания агара чашки Петри переворачивают крышками вниз и ставят в током виде в термостат с температурой $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ на 72 часа.

Учет реакции. Количество выросших колоний подсчитывают на каждой чашке, поместив её вверх дном на темном фоне, пользуясь лупой с увеличением в 4-10 раз. Каждую подсчитанную колонию отмечают на дне чашки чернилами. При подсчете колоний рекомендуется пользоваться счетчиками.

При большом числе колоний и равномерном их распределении дно чашки Петри делят на четыре и более одинаковых сектора, подсчитывают количество колоний на двух-трех секторах (но не менее чем на $1/3$ поверхности чашки), находят среднеарифметическое значение количества колоний и умножают на общее количество секторов всей чашки. Таким образом, находят общее количество колоний, выросших на одной чашке.

КМАФАнМ в 1см^3 или 1 г продукта **X** по каждой чашке Петри вычисляют по формуле:

$$X = n \times 10^m$$

где n – количество колоний, подсчитанных на чашке Петри;

m – число десятикратных разведений.

За окончательный результат анализа принимают среднеарифметическое, полученное по всем чашкам.

Методы микробиологического контроля питьевого молока.

Питьевое молоко – молочный продукт с массовой долей жира менее 10%, подвергнутый термической обработке, как минимум пастеризации, без добавления сухих молочных продуктов и воды, расфасованный в потребительскую тару (ГОСТ 31450-2013 Молоко питьевое. Технические условия).

Оценку эффективности пастеризации молока определяют согласно ГОСТ.

Фосфатазная проба - определение фосфатазы по реакции с фенолфталеинфосфатом натрия. Для определения эффективности пастеризации используется метод определения фосфатазы (фосфатазная проба). Фермент фосфатаза разрушается при пастеризации не ниже 63°C с выдержкой 30 минут. Отрицательная реакция на фосфатазу указывает о безвредности молока.

Метод основан на гидролизе фенолфталеинфосфата натрия ферментом фосфатазой, содержащейся в молоке и молочных продуктах. Освобождающийся при гидролизе фенолфталеин в щелочной среде дает розовое окрашивание. В обычную микробиологическую пробирку наливают 2 мл молока и 1 мл 0,1% раствора фенолфталеина фосфата натрия (рис. 16), закрывают пробкой и взбалтывают. Затем пробирку помещают в водяную баню с температурой воды $40 - 45^{\circ}\text{C}$ и определяют окраску содержимого пробирки через 10 минут и 1 час.



Рисунок 16 Фосфатазная проба с фенолфталеинфосфатом натрия

Учет реакции. При отсутствии фермента фосфатазы окраска содержимого пробирки не изменяется. Следовательно, молоко подвергалось пастеризации при температуре не ниже 63°C . При наличии фермента фосфатазы окраска содержимого пробирки приобретает от светло-розовой до ярко-розовой. Следовательно, молоко не подвергалось пастеризации или подвергалось пастеризации при температуре ниже 63°C , или было смешано с непастеризованным.

5 Задание

- 5.1 Провести микробиологический контроль сырого молока;
- 5.2 Провести микробиологический контроль питьевого молока

6 Контрольные вопросы:

- 6.1 Что такое сырое молоко?
- 6.2 Какое молоко называется питьевым?
- 6.3 Принцип постановки редуцтазной пробы.
- 6.4 Как определить уровень КМАФАнМ в сыром молоке?
- 6.5 Как оценивают эффективность пастеризации молока?

Практическое занятие №1

МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ МЯСА

1 Цель работы: Изучить органолептические и бактериологические методы микробиологического контроля мяса

2 Общие сведения.

Методы микробиологического исследования мяса. На мясокомбинатах и мясоперерабатывающих предприятиях микробиологическое исследование мяса и субпродуктов проводят в случаях, предусмотренных действующей нормативно-технической документацией, Правилами ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясопродуктов, по требованию органов, осуществляющих ветеринарный или санитарный надзор. Микробиологическое исследование мяса проводят также во всех случаях, когда предполагается наличие возбудителей зооантропонозов или возбудителей пищевых токсикозов и токсикоинфекций.

Согласно Правилам ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясопродуктов предусмотрено проводить бактериологическое исследование мяса и мясопродуктов при подозрении на сибирскую язву, рожу свиней, листериоз и другие инфекционные болезни в целях решения вопроса о возможности и порядке использования мяса и других продуктов убоя животных.

Микробиологическое исследование проводят в следующих случаях:

при вынужденном убое животных независимо от причины убоя и принадлежности животных, в том числе при отравлениях и подозрении в отравлении ядами;

при желудочно-кишечных заболеваниях, при тяжело протекающих заболеваниях дыхательных органов, при септико-пиемических заболеваниях;

при обнаружении серозных и фибринозных перикардитов у свиней, при обширных ожогах и во всех других случаях при подозрении на наличие сальмонелл или токсигенных кокков;

при удалении кишечника из туши позднее 2 ч с момента обескровливания животного;

при наличии сомнений в отношении пригодности мяса и невозможности определить его пригодность в пищу путём ветеринарно-санитарного осмотра.

Доброкачественность мяса определяют в сомнительных, спорных случаях оценки, т. е. при первых признаках порчи (ослизнение, гниlostное разложение, загар и т. д.). Свежесть мяса устанавливают с помощью следующих исследований:

- 1) органолептических,
- 2) биохимических,
- 3) бактериологических;
- 4) микроскопических.

Отбор образцов мяса проводят согласно ГОСТ Р 51447-99 Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб; ГОСТ 7269-2015 Мясо. Методы отбора образцов и органолептические методы определения свежести.

От каждой туши или её части отбирают для исследования целым куском массой не менее 200 г из следующих мест:

- у зареза, против 4-5-го шейных позвонков;
- в области лопатки;
- в области бедра из толстых частей мышц.

Образцы от замороженных блоков мяса и субпродуктов отбирают целым куском массой не менее 200 г. В образцах кроме мышечной ткани должны быть сухожилия и жир.

Каждый отобранный образец упаковывают в пергамент по ГОСТ 1341, целлюлозную пленку по ГОСТ 7730 или пищевую полиэтиленовую пленку по ГОСТ 10354.

На пергаменте или ярлыке, вложенном под пленку, простым карандашом обозначают наименование вида мяса (субпродуктов), номер туши, блока или её части, присвоенный при отборе образцов. Образцы, отобранные от одной туши, упаковывают вместе в бумажный пакет и помещают в контейнер.

Отобранные и подготовленные образцы сопровождают в лабораторию документом с обозначением: даты и места отбора образцов; вида скота; номера туши, присвоенного при приемке; причины и цели испытания, подписи отправителя.

При отправке образцов в лабораторию, находящуюся вне места отбора образцов, каждый образец упаковывают отдельно в пергамент, затем в оберточную бумагу по ГОСТ 8273. Ящик с образцами опечатывают и пломбируют.

В зависимости от характера заболевания на микробиологическое исследование направляют следующие пробы от туши: часть мышцы сгибателя или разгибателя передней и задней конечностей туши длиной не менее 8 см или кусок другой мышцы размером не менее 8×6×6 см; лимфатические узлы – поверхностный шейный или собственно подкрыльцовый и наружный подвздошный вместе с окружающей их соединительной и жировой тканями, а от свиней поверхностный шейный дорзальный (при отсутствии патологических изменений в области головы и шеи) или подкрыльцовый 1-го ребра и надколенный; долю печени с печеночным лимфатическим узлом или желчным пузырем, освобожденным от желчи; почку и селезенку.

Для бактериологического исследования на листериоз направляют: головной мозг, долю печени и почку.

Для исследования на сибирскую язву направляют лимфатический узел пораженного органа или лимфатический узел, собирающий лимфу с места локализации пораженного очага, отечную ткань, ухо, а у свиней, кроме того, подчелюстной лимфатический узел.

При исследовании **полутуш или четверти туши** берут кусок мышцы, лимфатические узлы и трубчатую кость.

Примечание: если берут часть печени, почки, селезенки, то поверхность разреза прижигают.

При исследовании соленого мяса, находящегося в бочечной таре, берут образцы мяса и имеющиеся лимфатические узлы сверху, из середины и со дна бочки, а также при наличии, трубчатую кость и рассол.

Образцы упаковывают каждый в отдельности в полиэтиленовую пленку по ГОСТ 10354 или пергамент по ГОСТ 1341, помещают в бумажный пакет, на

котором ставят дату отбора образца, номер туши и направляют в лабораторию в общей таре (ящике).

При пересылке образцов мяса в лабораторию, расположенную за пределами предприятия, тару с образцами опечатывают или пломбируют. В сопроводительном документе указывают: наименование продукта с указанием вида мяса и его количество, наименование предприятия и его адрес, номер образца, причину направления материала на исследование, краткие патологоанатомические данные и предполагаемый диагноз, дату взятия образцов и подпись лица, направившего образец на исследование.

3 Задание

3.1 Провести органолептическое исследование представленных проб мяса;

3.2 Провести микроскопию проб мяса;

3.3 Сделать посевы из проб мяса на определение наличия патогенных микроорганизмов.

Органолептическое исследование мяса проводят согласно ГОСТ 7269-2015 Мясо. Методы отбора образцов и органолептические методы определения свежести.

При органолептическом исследовании мяса определяют внешний вид и цвет мяса на поверхности и разрезе, консистенцию и запах мышечной ткани, состояние жира и сухожилий, прозрачность и аромат бульона (таблица 2).

Каждый отобранный образец анализируют отдельно.

Внешний вид и цвет мышц определяют внешним осмотром.

Вид и цвет мышц на разрезе определяют в глубинных слоях мышечной ткани на свежем разрезе мяса. При этом устанавливают наличие липкости путем ощупывания и увлажненность поверхности мяса на разрезе путем приложения к разрезу кусочка фильтровальной бумаги.

Консистенцию определяют на свежем разрезе туши или испытуемого образца легким надавливанием пальца образуют ямку и следят за её выравниванием.

Запах поверхностного слоя туши или испытуемого образца устанавливают органолептически. Затем стерильным ножом или скальпелем делают разрез и сразу определяют запах в глубинных слоях. Особое внимание обращают на запах мышечной ткани, прилегающей к кости.

Состояние жира определяют в момент отбора образцов, устанавливают цвет, запах и консистенцию жира, который определяют сжиманием и растиранием кусочков жира между пальцами.

Таблица 2 - Органолептическое исследование мяса

Наименование показателя	Характерный признак мяса или субпродуктов		
	свежее	сомнительной свежести	несвежее
Внешний вид и цвет поверхности туши или образца	имеет корочку подсыхания розового или красного цвета; размороженных туш красного цвета, жир	местами увлажнена, слегка липкая, потемневшая, темно-красная	сильно подсохшая, покрытая слизью серовато-коричневого цвета или плесенью

Наименование показателя	Характерный признак мяса или субпродуктов		
	свежее	сомнительной свежести	несвежее
	мягкий, частично окрашен в ярко-красный цвет.		
Мышцы на разрезе	на слегка влажные, не оставляют влажного пятна на фильтров. бумаге, цвет свойственный данному виду мяса: для говядины – от светло красного до темно-красного, для свинины – от светло-розового до красного, для баранины – от красного до красно-вишневого, для ягнятины - розовый	влажные, оставляют влажное пятно на фильтровальной бумаге, слегка липкие, темно-красного цвета; для размороженного мяса – с поверхности разреза стекает мясной сок, слегка мутноватый	влажные, оставляют влажное пятно на фильтров. бумаге, липкие, красно-коричневого цвета; для размороженного мяса – с поверхности разреза стекает мутный мясной сок
Консистенция	на разрезе мясо плотное, упругое; образующееся при надавливании пальцем ямка быстро выравнивается	на разрезе мясо менее плотное и менее упругое; образующаяся при надавливании пальцем ямка медленно (в течение 1 мин), жир мягкий, у размороженного мяса слегка разрыхлен	на разрезе мясо дряблое, образующаяся при надавливании пальцем ямка не выравнивается, жир мягкий, у размороженного мяса рыхлый, осалившийся
Состояние жира	говяжьего – белый, желтоватый или желтый; консистенция твердая при раздавливании крошится; свиного – белый или бледно-розовый, мягкий, эластичный; бараньего – белый, консистенция плотная. Жир не должен иметь запаха осаливания или прогоркания	имеет серовато-матовый оттенок, слегка липнет к пальцам, может иметь легкий запах осаливания	имеет серовато-матовый оттенок, при раздавливании мажется. Свиной жир может быть покрыт небольшим количеством плесени. Запах прогорклый
Запах	специфический, свойственный каждому виду свежего мяса	слегка кисловатый или с оттенком затхлости	кислый, затхлый, или слабогнилостный
Состояние сухожилий	сухожилия упругие, плотные, поверхность суставов гладкая, блестящая. У	сухожилия менее плотные, матово-белого цвета. Суставные поверхности слегка	сухожилия размягчены, сероватого цвета. Суставные

Наименование показателя	Характерный признак мяса или субпродуктов		
	свежее	сомнительной свежести	несвежее
	размороженного мяса сухожилия мягкие, рыхлые, окрашенные в ярко-красный цвет	покрыты слизью	поверхности покрыты слизью.
Прозрачность и аромат бульона	прозрачный и ароматный	прозрачный или мутный, с запахом не свойственным свежему бульону	мутный, с большим количеством хлопьев, с резким, неприятным запахом

Состояние сухожилий определяют в момент отбора образцов. Ощупыванием устанавливают их упругость, плотность и состояние суставных поверхностей.

Определение прозрачности и аромата бульона. Каждый образец мелко нарезают или пропускают через мясорубку (диаметр решетки 2 мм) и тщательно перемешивают. Взвешивают 20 грамм смеси и помещают в коническую колбу объемом 100 см³, заливают 60 см³ дистиллированной воды, тщательно перемешивают, закрывают часовым стеклом и ставят в кипящую водяную баню. В процессе нагревания до 80-85⁰С в момент появления паров определяют запах мясного бульона. Для определения прозрачности 20 см³ бульона наливают в мерный цилиндр вместимостью 25 см³, имеющий диаметр 20 мм, и устанавливают степень его прозрачности визуально.

Мясо или субпродукты, отнесенные к сомнительной свежести хотя бы по одному признаку, подвергают химическим и микроскопическим анализам.

Биохимическое исследование мяса. Определяют содержание летучих кислот, аммиачного азота, рН (концентрации водородных ионов) и др. (таблица 3).

Таблица 3 - Биохимическое исследование мяса

Качество мяса	рН мяса
Свежее мясо	рН не выше 6,2, количество аммиачного азота на 100гр мяса составляет не более 80 мг.
Мясо с частично изменённой свежестью	рН 6,2, количество аммиачного азота на 100гр мяса составляет не более 81 - 139 мг.
Несвежее мясо	рН выше 6,5, количество аммиачного азота на 100гр мяса составляет не более 132 мг.

Определение концентрации водородных ионов (рН). Приготовление фильтрат-экстракта. С поверхности мяса срезают кусочек, освобождают его от жира и сухожилий. Взвешивают 10 гр, мелко нарезают, помещают в колбу и заливают 100 мл дистиллированной воды, энергично встряхивают. Через 15 мин фильтруют через бумажный фильтр. Вытяжку исследуют колориметрическим методом по общей методике с паранитрофенолом. Определение рН мяса смотри в таблице 2.

Для определения pH универсальным индикатором берут 1 мл фильтрата-экстракта и одну каплю индикатора. Смешивают. Концентрацию водородных ионов определяют по шкале.

Бактериологическое исследование мяса проводят согласно ГОСТ Р 54354-2011 Мясо и мясные продукты. Общие требования и методы микробиологического анализа.

Приготовление взвеси для исследования. Каждую пробу освобождают от видимой жировой и соединительной тканей, погружают на 2-3 мин в спирт и два раза обжигают с поверхности. Затем вырезают стерильными ножницами из глубины различных мест кусочки 2,0×1,5×2,5 см; лимфатические узлы разрезают пополам. Затем все вырезанные кусочки измельчают стерильными ножницами. Для посева составляют две пробы по 15 г каждая. Одна проба состоит из кусочков мышц и лимфатических узлов, а вторая – из кусочков паренхиматозных органов (печени, почки и селезенки).

Каждую пробу помещают в стерильную колбу, добавляют 15 мл физраствора, гомогенизируют. 1 мл приготовленной взвеси содержит 0,5г продукта. Взвесь отстаивают 10 минут. Из надосадочной жидкости делают посев бакпетлей или пипеткой в МПА и элективные среды Эндо и Левина. Одновременно с посевом на плотные среды производят посев материала для накопления сальмонелл в одну из сред обогащения (селенитовый Ф-бульон, Мюллера, Кауфмана, Киллиана, хлористомagneзиевую среду «М»). Посевы помещают в термостат при температуре 37°С на 18 – 24 часа. Через 18 часов чашки просматривают и при отсутствии роста посевы выдерживают дополнительно до 24 часов.

Определение общего микробного числа (ОМЧ). Из верхней части надосадочной жидкости петлей вносят в 2 чашки Петри с МПА, тщательно втирают материал, культивируют в термостате при температуре 37°С 18 – 24 часа. После культивирования изучают культуральные свойства колоний, подсчитывают ОМЧ и из выросших колоний готовят мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют.

На МПА отыскивают колонии, характерные для сибирской язвы (*серо-белые, шероховатые с бахромчатыми краями колонии, напоминающие «голову медузы» или «львиную гриву»*), рожи свиней, пастереллеза, листериоза (*мелкие прозрачные колонии*), кокковых инфекций - диплококкоз, стафилококкоз, стрептококкоз (*мелкие, прозрачные или мутноватые колонии, иногда образующие различные пигменты*) и др. При обнаружении в мазках микробов, подозрительных на сибирскую язву, посевы на элективную среду и среду обогащения не производят.

Определение БГКП. Из верхней части надосадочной жидкости петлей вносят в чашки Петри с агаром Эндо и Левина, тщательно втирают материал, культивируют в термостате при температуре 37°С на 18 – 24 часа. На чашках с элективными средами Эндо (*колонии красные с металлическим блеском и без него, розовые с красным центром*) и Левина (*колонии блестящие темно-фиолетового цвета*) отыскивают колонии, характерные для БГКП. Из характерных колоний готовят мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют: грамотрицательные, мелкие палочки

Определение сальмонелл. Для накопления сальмонелл производят посев в среду обогащения (селенитовый Ф-бульон, Мюллера, Кауфмана, Киллиана, хлористомagneзиевую среду «М»). Для этого 20 см³ взвеси из мышц и лимфатических

узлов вносят в одну колбу, а 20 см³ взвеси из паренхиматозных органов – в другую. В каждый флакон наливают по 50 см³ среды обогащения. Посевы помещают в термостат при температуре 37⁰С (с селенитовым Ф-бульоном при температуре 43⁰С) на 18 час.

При отсутствии роста через 18 часов посевы выдерживают в термостате дополнительно до 24 часов.

Из среды обогащения производят посев в плотные селективные диагностические среды (агар Эндо или Левина), культивируют при температуре 37⁰С 18 – 24 час.

Колонии сальмонелл на агаре Эндо – круглые, бесцветные или слегка розоватые, прозрачные или полупрозрачные; на агаре Левина – прозрачные, бледные, нежно-розовые или розовато-фиолетовые круглые колонии.

Следует иметь в виду, что на селенитовом Ф-бульоне *S. typhi suis* и *S. cholerae suis*, как правило, не растут. Наилучший рост *S. cholerae suis* наблюдается на среде Киллиана.

Определение бактерий рода *Proteus* проводят посев в конденсационную воду скошенного МПА (метод Шукевича). Посевы культивируют в термостате при 37⁰С в течение 24 ч, после чего их просматривают для определения характера роста микроорганизмов. При положительной реакции на поверхности среды образуется вуалеобразный налет голубоватого цвета. Из характерных колоний готовят мазки для определения подвижности «висячая» или «раздавленная» капля и мазки для окрашивания по Граму. При микроскопии обнаруживают бактерии рода *Proteus* H-формы, подвижные, Гр⁻.

Определение анаэробов. На присутствие анаэробов мясо исследуют только в том случае, когда есть подозрение на наличие анаэробных инфекций (эмкар, злокачественный газовый отек и т. д.). Берут четыре пробирки со средой Китта—Тароцци, предварительно прогретой на кипящей водяной бане в течение 20-30 мин, а затем охлажденной до 50⁰С и вносят в каждую по 3-5 мл взвеси. Две пробирки с посевами прогревают при 80⁰С в течение 20 мин, остальные пробирки оставляют непрогретыми. Термостатируют при 37⁰С в течение 5-10 сут, наблюдение за ростом культур – ежедневно. При наличии анаэробных инфекций наблюдается активное газообразование и помутнение среды.

Микроскопическое исследование мяса проводят согласно ГОСТ 23392-2016 Мясо. Методы химического и микроскопического анализа свежести.

Метод микроскопического анализа основан на определении количества бактерий и степени распада мышечной ткани путем микроскопирования окрашенных по Граму мазков-отпечатков. Из каждой пробы мяса приготавливают от 2 до 10 мазков-отпечатков (из паренхиматозных органов, почек, селезенки, лимфатических узлов туши или из пораженных участков органов или ткани).

Для приготовления мазка-отпечатка из поверхностного слоя стерильными ножницами или скальпелем, придерживая пинцетом, вырезают кусочек мяса массой 2-3 г, прикладывают его внутренней срезанной стороной к предварительно профламбированной поверхности предметного стекла.

Для приготовления мазка-отпечатка из глубоких слоёв поверхность пробы мяса вначале стерилизуют (смочить спиртом и обжечь на пламени или прижечь нагретым металлическим (фарфоровым) шпателем). Затем стерильным

инструментом вырезают из глубины небольшие кусочки мяса размером 2,0×1,5×2,5см и делают мазки-отпечатки поверхностями срезов прикладывают к предметному стеклу (по три отпечатка на двух предметных стеклах). Препараты высушивают на воздухе, фиксируют, окрашивают по Граму, Ольту и микроскопируют.

Каждый мазок микроскопируют под иммерсионным объективом в 20-25 разных полях зрения микроскопа. При микроскопии обращают внимание на наличие возбудителя сибирской язвы, учитывают количество микробных клеток, подсчитывая отдельно количество кокковых, палочковидных, дрожжевых и др. клеток в каждом просмотренном поле зрения. Затем определяют их среднее арифметическое количество. Также отмечают наличие или отсутствие следов распада мышечной ткани (таблица 4).

Таблица 4 - Микроскопическое исследование мяса

Мазки-отпечатки	Микроскопическая картина
Свежее мясо	Микробных клеток нет или видны единичные клетки кокков и палочковидных бактерий (до 10 клеток). Следов распада мышечной ткани нет.
Мясо сомнительной свежести (с частично изменённой свежестью). Мясо птицы с признаками порчи I степени.	Наличие в поле зрения микроскопа не более 30 кокков и/или палочковидных клеток. Заметны следы распада мышечной ткани: ядра мышечных волокон в состоянии распада, исчерченность мышечных волокон выражена слабо. Мясо птицы относят к мясу с признаками порчи I степени.
Несвежее мясо. Мясо птицы с признаками порчи II степени.	Поле зрения микроскопа усеяно большим количеством микробных клеток (более 30 кокков и/или палочек) с преобладанием палочковидных форм. Наблюдается значительный распад мышечной ткани: почти полное исчезновение ядер и полное исчезновение исчерченности мышечных волокон. Мясо птицы относят к мясу с признаками порчи II степени.

4 Контрольные вопросы:

- 4.1 С помощью каких исследований устанавливают свежесть мяса?
- 4.2 Что определяют при органолептическом исследовании мяса?
- 4.3 Как готовят пробы мяса для бактериологического исследования?
- 4.4 В какие среды делают посеы исследуемых проб мяса?
- 4.5 Как проводят микроскопическое исследование мяса?

Практическое занятие № 2

МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ЯИЦ

1 Цель работы: Изучить методы микробиологического исследования яиц.

2 Общие сведения. Методы микробиологического исследования яиц. Пищевые куриные яйца согласно ГОСТ 31654-2012 Яйца куриные пищевые. Технические условия.

Яйца, в зависимости от срока хранения, классифицируют по следующим видам:

Диетические яйца – яйца, срок хранения которых не превышает 7 суток.

Столовые яйца – яйца, срок хранения которых при температуре от 0⁰С до 20⁰С составляет от 8 до 25 сут, и яйца, которые хранились в промышленных холодильниках на предприятии-производителе при температуре от минус 2⁰С до 0⁰С не более 90 сут.

Яйца в зависимости от их массы (таблица 4) подразделяют на пять категорий.

Таблица 4 Категории яиц

Категория		Масса одного яйца, гр
Высшая	В	75 и выше
Отборная	О	от 65 до 74,9
Первая	1	от 55 до 64,9
Вторая	2	от 45 до 54,9
Третья	3	от 35 до 44,9

Каждое яйцо маркируют средствами, разрешенными уполномоченными органами и не влияющими на качество продуктов. Маркировка яиц должна быть четкой, легко читаемой. Яйца маркируют методом штемпелевания, напыления или иным способом, обеспечивающим четкость маркировки. Высота цифр и букв, обозначающих наименование, категорию и дату сортировки, должны быть не менее 3 мм. На диетических яйцах указывают: вид яиц, категорию и дату сортировки (число и месяц); на столовых – только вид яиц и категорию. Вид яиц при маркировке обозначают: диетические – Д, столовые – С. Категорию яиц обозначают: высшая – В, отборная – О, первая – 1, вторая – 2, третья – 3.

Санитарно-микробиологическое исследование яиц проводят: по эпидемиологическим показателям (поступления яиц из хозяйств, неблагополучных по сальмонеллезу и другим инфекционным болезням), при возникновении инфекционных заболеваний птиц и подозрении на контаминацию яиц патогенными микроорганизмами; при текущем санитарном надзоре за птицеводческими хозяйствами; на предприятиях различной формы собственности, выпускающих пищевые продукты с использованием яиц, когда возникает сомнение в качестве яйцепродуктов при овоскопии.

Отбор проб для исследования. Для проверки соответствия качественных характеристик яиц, посторонних запахов, состояния скорлупы от партии яиц

проводят выборку в соответствии с требованиями таблицы 5. Упаковочные единицы отбирают из разных мест партии (сверху, из середины, снизу).

Таблица 5 Отбор проб от партии яиц (в штуках)

Количество упаковочных единиц в партии	Количество отбираемых упаковочных единиц
До 10 включ.	1
От 11 до 50	3
От 51 до 100	5
От 100 до 500	12
От 501 до 1000	24

Для проведения контроля из выбранных упаковочных единиц отбирают прокладки и яйца в количестве, указанном в таблице 6.

Таблица 6 Отбор проб из выбранных упаковочных единиц (в штуках)

Количество отобранных упаковочных единиц	Количество прокладок отбираемых из каждой упаковочной единицы	Общее количество отбираемых яиц (объем выборки)
1	12	360
3	6	540
5	5	750
12	3	1080
24	2	1440

При использовании транспортной и потребительской тары меньшей вместимости (4,6,10,12 и 15 штук) общее количество отобранных яиц должно быть не менее, чем указано в таблице 7.

Таблица 7 Отбор проб при использовании тары меньшей вместимости

Количество яиц, штуки	Объем выборки, %
До 360 включ	10
От 361 до 3600	5
От 3601 до 10800	3
От 10801 до 36000	1
Св. 36000	0,5

Для определения качественных характеристик, категории, чистоты скорлупы, запаха отбирают от объединенной пробы 50% яиц.

Для определения микробиологических показателей от объединенной пробы отбирают 25% яиц, но не менее 30 штук.

Согласно ГОСТу при микробиологическом исследовании определяют количество бактерий группы кишечных палочек, наличие сальмонелл и бактерий рода *Proteus*, а также исследуют яйца и яичные продукты на содержание микроскопических грибов.

3 Задание

3.1 Определить чистоту скорлупы, запах содержимого яиц, плотность и цвет белка, состояние и положение желтка;

3.2 Провести овоскопирование яиц;

3.3 Провести посев на питательные среды.

Определение чистоты скорлупы, запаха содержимого яиц, плотности и цвета белка, состояния и положения желтка.

Чистоту скорлупы проверяют визуально при ярком рассеянном свете или люминесцентном освещении. Скорлупа яиц должна быть чистой, без пятен крови и помета, и неповрежденной. Допускается:

- на скорлупе диетических яиц наличие единичных точек или полосок (следов от соприкосновения яиц с полом клетки или транспортером для сбора яиц);

- на скорлупе столовых яиц – пятен, точек и полосок (следов от соприкосновения яиц с полом клетки или транспортером для сбора яиц), занимающих не более 1/8 её поверхности.

Овоскопирование - просмотр яйца в проходящем свете. Для этой цели используют прибор овоскоп, он представляет собой ящик, в верхней части которого имеются отверстия для помещения яиц. Внутри овоскопа должен быть источник света (обычно электрическая лампочка). Просмотр яиц эффективнее проводить в затемненном помещении, но при более сильном источнике света, им можно пользоваться и при естественном освещении. С помощью овоскопа устанавливают наличие микробных поражений в яйце. В таких местах можно обнаружить темные (задерживающие свет) участки. Они могут быть разные по форме, размерам и представляют собой колонии микробов.

При просвечивании яиц определяют целостность и качество скорлупы – «мраморность» и малозаметную поврежденность (насечка, внутренние трещины), состояние подскорлупной пленки, величину и место расположения пуги, целостность градинок и желточной оболочки, степень окраски желтка.

Проба с погружением в воду. Яйцо осторожно погружают тупым концом в стакан с водой. При этом испорченное яйцо стоит на дне или всплывает, свежее ложится на дно стакана.

Запах содержимого яиц определяют органолептически. Содержимое яиц не должно иметь посторонних запахов (гнилости, тухлости, затхлости и др.).

Плотность и цвет белка, состояние и положение желтка определяют визуально путем выливания яйца на гладкую поверхность. Яйца по качественным характеристикам (положению желтка, плотности и цвету белка) должны соответствовать требованиям таблицы 8.

Таблица 8 - Качественные характеристики яиц

Вид яиц	Характеристика		
	Состояние воздушной камеры и её высота	Состояние и положение желтка	Плотность и цвет белка
Диетические	Неподвижная; высота – не более 4 мм	Прочный, занимает центральное положение и не перемещается	Плотный, светлый, прозрачный
Столовые: хранившиеся при температуре от 0 ⁰ С до 20 ⁰ С	Неподвижная или допускается некоторая подвижность; высота	Прочный, может слегка перемещаться, допускается небольшое отклонение от	Плотный, светлый, прозрачный

Вид яиц	Характеристика		
	Состояние воздушной камеры и её высота	Состояние и положение желтка	Плотность и цвет белка
	– не более 7 мм	центрального положения	
хранившиеся в промышленных или торговых холодильниках при температуре от минус 2 ⁰ С до 0 ⁰ С	Неподвижная или допускается некоторая подвижность; высота – не более 9 мм	Прочный, перемещающийся от центрального положения	Плотный, допускается недостаточно плотный, светлый, прозрачный
<p><i>Примечание:</i> Недостаточно плотный белок – белок, который при выливании на гладкую поверхность слегка растекается. Незначительно перемещающийся от центра желток – видимый, слегка распластаный, подвижный желток.</p>			

Микробиологический анализ проводят согласно ГОСТ 32144-2013 Пищевые продукты переработки яиц сельскохозяйственной птицы. Методы микробиологического анализа.

Исследование поверхности яиц. Общую бактериальную обсемененность поверхности яиц (КМАФАнМ) определяют на МПА.

Стерильным влажным тампоном протирают поверхность яиц и помещают тампон в стерильную пробирку. В эту пробирку наливают 9 см³ стерильной воды, получают разведение 1:10. Пробирку тщательно встряхивают в течение 3-5 мин. Затем вносят в 2 стерильные чашки Петри по 0,1 см³ полученного разведения, заливают МПА, охлажденным до температуры 45⁰С, объемом 10–12 см³, перемешивают и после застывания термостатируют при температуре 37⁰С в течение 48 часов.

Все выросшие колонии подсчитывают, определяют среднее арифметическое число колоний по двум чашкам одного разведения, умножают на величину разведения и делят на площадь поверхности скорлупы яиц. В результате получают количество микроорганизмов на 1 см² скорлупы (КОЕ/см²). Площадь скорлупы определяют по формуле:

$$S = 3,14 \frac{BP}{2},$$

где В – ширина яйца, Р – длина окружности, в см.

Примечание: КМАФАнМ – количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

Приготовление мазка из содержимого яйца и окраска по Граму. Поверхность скорлупы моют мыльной водой, погружают в спирт на 10 мин и обжигают над пламенем спиртовки. На остром конце яйца делают отверстие диаметром 1 см стерильным пинцетом, содержимое выливают в стерильную колбу со стеклянными шариками и гомогенизируют (смешивают) до однородной массы. Готовят мазок, окрашивают по Граму и рассматривают его под микроскопом. По составу и количеству микробов судят о процессах, происходящих в яйце.

Определение КМАФАнМ (в КОЕ/г) в содержимом яйца. Поверхность скорлупы моют мыльной водой, погружают в спирт на 10 мин и обжигают над пламенем спиртовки. На остром конце яйца делают отверстие диаметром 1 см стерильным пинцетом, содержимое выливают в стерильную колбу со стеклянными шариками и гомогенизируют до однородной массы. Пробу подогревают на водяной бане при 20°C в течение 5 минут, затем 10 мл массы смешивают с 90 мл физ.раствора, получают разведение 1:10 (10^{-1}). Далее готовят последовательные разведения до 1:10⁻⁵ в физиологическом растворе. Для этого берут 4 пробирки содержащие по 9 см³ физраствора, в первую пробирку вносят 1 мл из колбы с приготовленным разведением 1:10 и получают разведение 1:100 (10^{-2}). Из пробирки с разведением 1:100 вносят 1 мл в следующую пробирку, получают разведение 1:1000 (10^{-3}) и т.д. до разведения 1:10⁻⁵. По 1 мл полученных разведений вносят в чашки Петри (2 чашки на каждое разведение) и заливают расплавленным и охлажденным до 45°C МПА. Перемешивают, и после застывания агара инкубируют при 30°C в течение 72 ч.

Учет результата: содержание МАФАнМ в содержимом яйца должно быть не более 5×10^5 КОЕ/г.

Определение бактерий группы кишечных палочек. Для определения БГКП готовят последовательные десятикратные разведения содержимого яйца в физиологическом растворе 0,1; 0,01; 0,001 см³ (аналогично п. 2.6). Затем 1 см³ каждого разведения (т. е. по 1 мл из десятикратных разведений) высевает в пробирки со средой Кесслер содержащие бродильные пробирки Уленгута. Посевы культивируют в термостате при 43-44°C в течение 24-48 ч.

При росте БГКП на среде Кесслер в поплавке образуется газ. При обнаружении газа в поплавке на среде Кесслер проводят высеив на чашки Петри со средой Эндо, Плоскирева, или Левина и помещают в термостат при 37°C на 18-20 ч.

На среде Эндо бактерии группы кишечной палочки образуют темно-красные колонии с металлическим блеском или розово-красные без блеска; на среде Плоскирева – кирпично-красные с глянцевой поверхностью; на среде Левина – темно-фиолетовые колонии или фиолетово-черные блестящие. Из подозреваемых колоний готовят мазки, которые окрашивают по Граму.

Обработка результатов. Обнаружение Гр- не образующих спор палочек указывает на наличие бактерий группы кишечной палочки.

Определение наличия сальмонелл. Поверхность скорлупы моют мыльной водой, погружают в спирт на 10 мин и обжигают над пламенем спиртовки. На остром конце яйца делают отверстие диаметром 1 см стерильным пинцетом, содержимое выливают в стерильную колбу со стеклянными шариками и гомогенизируют (смешивают) до однородной массы. 25 см³ полученной массы вносят в мерные колбы содержащие 225 см³ стерильной среды обогащения Кауфмана, тщательно встряхивают и помещают в термостат для культивирования при температуре 37°C. Через 16-24 ч после тщательного перемешивания делают посев из среды обогащения по 0,1 см³ на поверхность среды Эндо, Плоскирева или Левина распределяя материал шпателем по поверхности среды. Посевы культивируют при температуре 37°C в течение 16-48 ч.

На среде Эндо сальмонеллы растут в виде круглых бесцветных или с розовым оттенком колонии. На среде Плоскирева сальмонеллы растут в виде бесцветных

колоний, но колонии более плотные и несколько меньшего размера, чем на среде Эндо. На среде Левина сальмонеллы растут в виде прозрачных, бледных, нежно-розовых или розовато-фиолетовых колоний.

Изолированные колонии, характерные для сальмонелл, пересевают на углеводные среды в короткий пестрый ряд, включая среды с глюкозой, лактозой, сахарозой, маннитом и мальтозой, полужидкий агар уколом (для определения подвижности) и бульон Хоттингера для определения образования индола и сероводорода. Из подозрительных колоний готовят мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют и изучают серологические свойства микроорганизмов путем постановки пробной агглютинации на предметном стекле с агглютинирующей адсорбированной поливалентной сальмонеллезной О-сывороткой. При получении положительной реакции проводят идентификацию с помощью монорецепторных агглютинирующих О-сывороток.

Обработка результатов. Обнаружение подвижных Гр- палочек, неферментирующих лактозу и сахарозу, ферментирующих глюкозу и манит с образованием кислоты и газа, дающих положительную реакцию агглютинации с монорецепторными О- и Н- сальмонеллезными сыворотками, указывает на наличие бактерий из рода сальмонелл.

Выявление бактерий рода *Proteus*. Для подтверждения наличия протей в Н-форме 0,5 см³ содержимого яйца вносят в конденсационную воду свежескошенного МПА, не касаясь поверхности среды (метод Шукевича). Вертикально поставленные пробирки помещают в термостат при 37°C и культивируют в течение 18-24 ч.

На скошенном МПА культура поднимается из конденсационной жидкости вверх по поверхности среды в виде вуалеобразного налета с голубым оттенком. Из культуры готовят мазки, окрашивают по Граму, определяют подвижность в раздавленной или висячей капле. Для обнаружения неподвижных О-форм можно проводить посев на поверхность агара Плоскирева. О-форма протей растет на этой среде в виде прозрачных колоний, окрашивая её в желтый цвет.

Обработка результатов. Обнаружение полиморфных грамотрицательных палочек, образующих характерный рост на средах в Н-форме (подвижные) и О-форме (неподвижные), ферментирующих глюкозу, неферментирующих лактозу и манит, указывает на наличие бактерий из рода протей.

Определение количества микроскопических грибов. Для определения количества микроскопических грибов готовят последовательные десятикратные разведения содержимого яйца в физиологическом растворе 0,1; 0,01; 0,001 см³. Затем высевают по 1 см³ из каждого приготовленного разведения в чашки Петри с последующей заливкой теплым расплавленным агаром Сабуро объемом 10 – 15 мл. Посевы культивируют при 25°C в течение 4 сут. Из выросших на питательной среде колоний, типичных для плесневых грибов по внешнему виду, готовят препарат раздавленная капля и изучают его под объективами сухой системы микроскопа (x8, x40).

4 Контрольные вопросы:

4.1 Как отбирают пробы для микробиологического исследования яиц?

4.2 Какие используют методики для выявления в яйце сальмонелл, протей, бактерий группы кишечных палочек, микроскопических грибов?

4.3 Как определяют чистоту скорлупы, запах содержимого яиц, плотность и цвет белка?

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Госманов, Р. Г. Микробиология и иммунология [Текст] : учебное пособие / Р. Г. Госманов, А. И. Ибрагимова, А. К. Галиуллин. - 2-е изд., перераб. и доп. - Санкт-Петербург ; Москва ; Краснодар : Лань, 2013. - 239 с.
2. Емцев, В. Т. Сельскохозяйственная микробиология [Текст] : учебник для академического бакалавриата / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин ; Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К. А. Тимирязева. - Москва : Юрайт, 2017. - 205 с.
3. Ильясова, З. З. Общая ветеринарная микробиология, микология и иммунология [Текст] : учебное пособие для обучающихся по специальности "Ветеринария" и направлению подготовки (аспирантура) "Ветеринария и зоотехния" / З. З. Ильясова, А. В. Андреева ; рецензенты: А. К. Галиуллин, В. В. Гимранов ; Министерство сельского хозяйства Российской Федерации, Башкирский государственный аграрный университет. - Уфа : Башкирский ГАУ, 2022. - 111 с.
4. Маннапова, Р. Т. Микробиология и иммунология. Практикум [Текст] : учеб. пособие / Р. Т. Маннапова. - М. : ГЭОТАР-МЕДИА, 2013. - 540 с.
5. Санитарная микробиология пищевых продуктов [Текст] : учебное пособие для подготовки бакалавров по направлению «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции» / Р. Г. Госманов [и др.]. - 2-е изд., испр. - Санкт-Петербург ; Москва ; Краснодар : Лань, 2015. - 559 с.
6. Сидоренко, О. Д. Микробиология продуктов животноводства (практическое руководство) [Текст] : учебное пособие для студентов вузов, обучающихся по направлению подготовки 35.03.07 "Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции" (квалификация (степень) "бакалавр") / О. Д. Сидоренко. - Москва : ИНФРА-М, 2017. - 172 с.
7. Экология микроорганизмов [Текст] : учебник для бакалавров / [А. И. Нетрусов [и др.] ; под ред. А. И. Нетрусова. - 2-е изд. - Москва : Юрайт, 2015. - 267 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(рекомендуемое)

Сведения, которые должны быть указаны в акте об отборе проб

В акте об отборе проб должны быть указаны следующие сведения:

Цель отбора проб _____

Расположение и наименование места отбора проб _____

Дата отбора _____

Время (начало и окончание) отбора проб _____

Климатические условия окружающей среды на месте отбора проб:

температура воздуха _____

температура воды _____

Стадия обработки воды:

обеззараживание _____

окисление _____

умягчение _____

другие виды обработки _____

Определения, выполненные на месте отбора пробы:

Способ консервации _____

Особенности отбора и хранения пробы _____

Продолжительность хранения _____

Оборудование, используемое для отбора проб _____

Емкости для отбора проб (материал) _____

Должность, фамилия, имя, отчество лица, отобравшего пробу, и его подпись.