

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

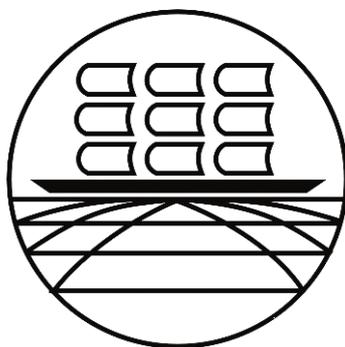
«МУРМАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ФГБОУ ВО «МГТУ»)

«ММРК имени И.И. Месяцева» ФГБОУ ВО «МГТУ»

УТВЕРЖДАЮ
Начальник ММРК им. И.И. Месяцева
ФГБОУ ВО «МГТУ»


И.В. Артеменко

«31» августа 2019 г.



МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ЛАБОРАТОРНЫМ РАБОТАМ

учебной дисциплины ОП.03 Микробиология, санитария и гигиена
программы подготовки специалистов среднего звена (СПССЗ)
специальности 35.02.09 Ихтиология и рыбоводство
по программе базовой подготовки
форма обучения: очная

Мурманск
2019

Рассмотрено и одобрено на заседании

Методической комиссии преподавателей дисциплин профессионального цикла специальностей отделения Промышленное рыболовство

Председатель МК

В.А. Обносков

Протокол от 29 мая 2019 г.

Автор (составитель): Литвинова М.Ю. доцент кафедры микробиологии и биохимии ФГБОУ ВО «МГТУ», кандидат биологических наук

Содержание

1	Лабораторная работа 1 Тема: «Общие требования к лаборатории микробиологии»	4
2	Лабораторная работа 2 Тема: «Устройство микроскопа»	8
3	Лабораторная работа 3 Тема: «Стерилизация. Методы и средства стерилизации».	11
4	Лабораторная работа 4 Тема: «Морфология микроорганизмов»	13
5	Лабораторная работа 5 Тема: «Изучение культуральных свойств микроорганизмов»	19
6	Лабораторная работа 6 Тема: «Спиртовое и маслянокислое брожения»	21
7	Лабораторная работа 7 Тема: «Определение качества рыбного и мясного сырья»	26
8	Лабораторная работа 8 Тема: «Микробиологическое исследование воздуха»	30
9	Лабораторная работа 9 Тема: «Санитарно-микробиологическое исследование оборудования, рук и спецодежды персонала»	31

Лабораторная работа №1

Общие требования к лаборатории микробиологии

Задание:

1. Ознакомиться с организацией микробиологической лаборатории, изучение правил техники безопасности при работе в ней.
2. Ознакомиться с основным оборудованием микробиологической лаборатории.

1.1. Назначение и функционирование лаборатории микробиологии

Независимо от назначения лаборатория микробиологии (учебная, производственная, научно-исследовательская) состоит из нескольких обязательных помещений: помещения для бактериологических исследований, помещения для приготовления и разлива питательных сред, помещения для мытья лабораторной посуды и дезинфекционно-стерилизационного помещения, в котором осуществляются стерилизация питательных сред и микробиологической посуды, обеззараживание посуды и отработанного материала. Все помещения должны быть сухими, светлыми, хорошо вентилируемыми, иметь подвод газа, горячей и холодной воды и устройство для ее отвода.

Стены комнаты окрашивают масляной краской светлых тонов. Полы покрывают линолеумом или легко моющимися плитам. Поверхность столов покрывают пластиком, что облегчает их мойку и дезинфекцию. Столы снабжают удобными для работы винтовыми табуретами.

В помещении микробиологической лаборатории дважды в день производят влажную уборку. Пол, стены и мебель периодически протирают дезинфицирующими растворами: 2...3%-ным раствором соды (двууглекислого натрия), 3...5%-ным раствором фенола, 0,5...3%-ным раствором хлорамина, 0,5%-ным раствором четвертичных аммонийных соединений. Два-три раза в месяц, особенно после работы с мицелиальными грибами, для уничтожения микроорганизмов в воздухе и на различных поверхностях помещение лаборатории подвергают специальной обработке — облучению переносными и стационарными бактерицидными лампами продолжительностью от 30 мин до нескольких часов.

Некоторые работы с микроорганизмами, требующие абсолютной стерильности (пересевы чистых культур, выделение и др.), проводят в специальном изолированном помещении - боксе. Бокс разделяют на две части: рабочее помещение и предбоксник, что исключает резкую циркуляцию воздуха и занесение микроорганизмов извне. В боксе устанавливают стол, стулья, газовые горелки, подвешивают или укрепляют на выдвигающемся кронштейне бактерицидные лампы. Помещение бокса периодически моют и дезинфицируют, а после уборки и перед работой в течение 15... 30 мин облучают бактерицидными лампами.

В помещении для бактериологических исследований устанавливают рабочие столы, шкафы с инструментами, стерильной посудой и реактивами, центрифуги и другие вибрирующие аппараты, холодильники для хранения препаратов и чистых культур, термостаты.

В дезинфекционно-стерилизационном помещении размещают автоклавы для стерилизации питательных сред и посуды, отдельный автоклав для термической обработки использованной лабораторной посуды (колб, пробирок, пипеток, содержащих живые микроорганизмы).

Помещение для мытья лабораторной посуды оборудуют удобными раковинами (или ваннами) с подводкой горячей и холодной воды, стеллажами для сушки посуды, газовыми или электрическими плитам и посудой для варки питательных сред, весами, дистилляторами воды.

В учебной лаборатории за каждым студентом закрепляют постоянное рабочее место и приборы. На лабораторном столе устанавливают спиртовую горелку, набор красителей, бактериологические петли и иглы, штатив для пробирок, градуированные и пастеровские пипетки, стеклянные шпатели, предметные стекла обычные и с углублением, покровные стекла, стеклянный мостик и ванночку для окраски препаратов, емкость с водой для промывания, дезинфицирующую жидкость, банку с ватой, фланелевую (марлевую) салфетку, карандаш по стеклу, иммерсионное масло, песочные часы, фильтровальную бумагу,

нарезанную по размеру предметного стекла, спички.

Микроскоп помещают на столе, покрывают стеклянным колпаком или полиэтиленовым чехлом. Рабочее место должно содержаться в чистоте. Поверхность стола протирают ватными тампонами, смоченными хлорамином, 70%-ным (по объему) этанолом. Спирты могут быть использованы и для дезинфекции рук.

Правила работы в лаборатории микробиологии. В лабораториях микробиологии соблюдается такой же режим работы, как и в других санитарно-бактериологических лабораториях, где работают с заразным материалом. Следует помнить и то, что между патогенностью и непатогенностью микроорганизмов нет резкой разницы. Примером может служить все увеличивающаяся роль условно-патогенных микроорганизмов в патологии человека, особенно в этиологии внутрибольничных инфекций. Поэтому со всеми бактериями необходимо работать как с потенциальным источником опасности для здоровья человека. Студенты должны соблюдать правила, обеспечивающие стерильность в работе, исключая возможность внутрилабораторного заражения, развития аллергии у персонала и распространения патогенных бактерий за пределы лаборатории. К этим правилам относятся следующие требования.

1. Работа должна производиться в специальной одежде (халате).
2. **Запрещается** входить в лабораторию без халата, выходить в нем за пределы лаборатории и надевать на него верхнюю одежду.
3. Двери лаборатории должны быть закрыты.
4. В помещении лаборатории **запрещается** хранить посторонние вещи, принимать пищу, курить.
5. Все манипуляции (посевы микроорганизмов, вскрытие ампул, обработка материала, фильтрование, центрифугирование и т.д.) необходимо выполнять осторожно, не допуская образования аэрозолей.
6. **Запрещается** набирать растворы пипеткой ртом, необходимо пользоваться специальными приспособлениями: шаровидной грушей, поршневыми дозаторами или другими аппаратами, исключая попадание микробов в рот.
7. До и после работы необходимо тщательно мыть и дезинфицировать поверхность стола, на котором проводится работа с микроорганизмами. Микробная масса не должна загрязнять руки, стол и окружающие предметы. Петли, иглы, пинцеты после каждого соприкосновения с микроорганизмами прожигают в пламени спиртовки или газовой горелки и ставят в специальный штатив. Пролившуюся микробную взвесь обезвреживают, используя дезинфицирующие средства.
8. По окончании работы загрязненную микроорганизмами посуду немедленно стерилизуют кипячением или автоклавированием, чтобы уничтожить живые клетки, и только после этого ее моют.
9. При работе с бактерицидными лампами пользуются темными или простыми защитными очками. Нельзя смотреть на свет лампы незащищенными глазами, так как это может привести к потере зрения.
10. Следует строго соблюдать личную гигиену — тщательно дезинфицировать и мыть руки с мылом после окончания работы и перед едой.

В специальном журнале студенты и сотрудники делают запись о проведении инструктажа и ознакомлении с режимом работы в лаборатории.

1.2. Аппараты и приборы

Термостат. Воздушные термостаты предназначены для выращивания микроорганизмов на питательных средах при постоянной заданной температуре. В лаборатории устанавливают несколько термостатов с разной рабочей температурой, благоприятной для развития отдельных групп микроорганизмов: для мезофилов - 28...30°C, термофилов - 43...55 °C, патогенных видов - 37 °C. Термостаты бывают разной формы, размеров и конструкций: от небольшого шкафчика до политермостата с несколькими отделениями или отдельной термостатной комнаты.

Автоклав. Служит для стерилизации посуды, питательных сред и других материалов насыщенным паром под давлением выше атмосферного. Автоклавы бывают вертикальные или

горизонтальные, но принципиальная схема их устройства одинакова.

Сушильный шкаф. Предназначен для сушки и стерилизации лабораторной посуды, высушивания различных материалов до постоянной массы. Сушильный шкаф изготавливают из термостойких материалов с расчетом на диапазон температур в рабочей камере от 40 до 200°C. Длительность разогревания до предельной температуры около 1,5 ч. Внутри шкаф оборудован полками из дырчатых листов металла, на которых размещают посуду или высушиваемый материал.

Холодильник бытовой. Используют для хранения при температуре около $(4\pm 1)^\circ\text{C}$ музейных и рабочих культур микроорганизмов, питательных сред, некоторых реактивов и растворов, исследуемого материала, в том числе пищевых продуктов.

Центрифуга. Служит для разделения жидких и твердых фаз суспензий и взвесей. Она снабжена двумя роторами, которые попеременно насаживаются на вал электродвигателя: ротор-крестовина с четырьмя стаканами и ротор углового типа с гнездами для стеклянных или полиэтиленовых пробирок. Скорость вращения роторов от 3000 до 6000 об/мин.

Лабораторный pH-метр. Предназначен для измерения активности ионов водорода (pH) и окислительно-восстановительного потенциала (Eh).

Посуда. Для микробиологических исследований используют стеклянную или пластмассовую (одноразовую) посуду: чашки Петри применяют для выделения чистых культур, количественного учета микроорганизмов, анализа микрофлоры на плотных питательных средах и других исследований; колбы, пробирки, флаконы.

Кроме специальной микробиологической посуды используют обычную химическую посуду: колбы плоскодонные, конические, круглодонные, мерные (25, 50, 100, 200 мл); пипетки градуированные (1, 2, 5, 10 мл), пробирки биологические 18x2, 18x1,5, 15x1,5 см; бюретки, мензурки, цилиндры, бюксы, склянки. В настоящее время все большее распространение получает использование одноразовых чашек Петри и дозиметрических механических пипеток со съемными наконечниками.

Инвентарь. В микробиологической практике применяют петли, иглы, пинцеты, ножницы, сверла для пробок, металлические цилиндры для пипеток, проволочные или металлические с отверстиями корзины для стерилизации пробирок, пластмассовые или металлические штативы для пробирок и др.

Петли и иглы изготавливают из платиновой, никелевой или хромоникелевой проволоки длиной 8 см, диаметром 0,2...0,5 мм, которые впаивают в стеклянные палочки или вставляют в металлические держатели. Свободный конец проволоки аккуратно загибают в виде петли с плотно прижатым концом (рис. 1), иначе жидкость в кольце не будет удерживаться.

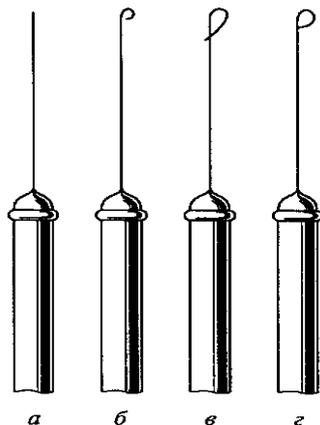


Рис. 1. Игла и петли для пересева микроорганизмов:

a - игла; *б, в* - петли изготовлены неправильно; *г* - петля изготовлена правильно

Задания

- Жидкость в пипетку набирают:
 - втягивая ее ртом;
 - с помощью резиновой груши;
 - наклоняя банку с реактивом;
 - с помощью специального дозатора.
- Зажигать спиртовку следует:
 - спичкой;
 - от другой спиртовки;

- с) свечкой;
- д) зажигалкой.

3. Спиртовка имеет следующие части:

- а) резервуар
- б) фитиль
- с) подставка
- д) колпачок

4. Выберите правильные суждения

- а) спиртовку можно зажигать от другой спиртовки
- б) нельзя дуть на спиртовку
- с) тушить пламя спиртовки можно колпачком
- д) пробирку с веществом сразу греют в нужном месте.
- е) при нагревании отверстие пробирки должно быть направлено в сторону от себя и соседей.

5. Что нельзя делать при работе со спиртовкой?

- а) тушить огонь колпачком
- б) зажигать спичками
- с) заполнять этиловым спиртом
- д) зажигать от другой спиртовки

6. Назначение автоклава

- а) поддержание постоянной температуры
- б) сушка лабораторной посуды
- с) стерилизация инструментария

7. Прибор, предназначенный для поддержания постоянной температуры

- а) Автоклав
- б) Термостат
- с) Рефрижератор

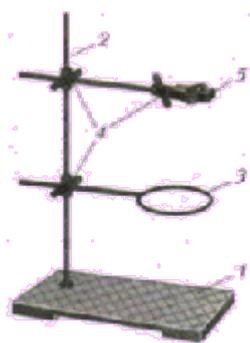


рис. 2.

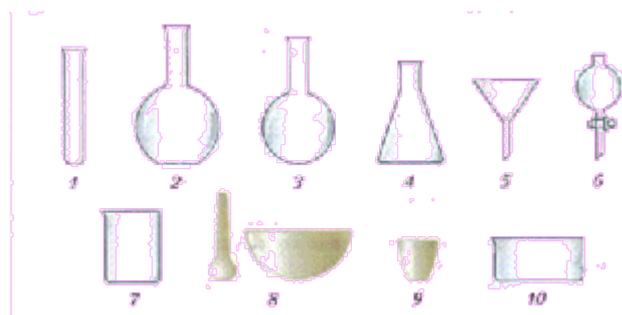


рис. 3.



рис. 1.

8. На рис. 3. изображена спиртовка. Какой цифрой обозначен фитиль?

- а. 1; б. 2; в. 3; г. 4.

9. На рис. 1. изображен лабораторный штатив. Какой цифрой обозначена лапка?

- а. 1; б. 2; в. 3; г. 5.

10. На рис. 2. изображена лабораторная посуда. Какой цифрой обозначена круглодонная колба?

- а. 2; б. 3; в. 4; г. 7;

11. На рис. 2. изображена лабораторная посуда. Какой цифрой обозначен фарфоровый тигель?

- а. 7; б. 8; в. 9; г. 10.

12. Для стерилизации паром под давлением применяется:

- а) аппарат Кротова
- б) анаэростат

в) сухожаровой шкаф

г) термостат

д) автоклав

13. Стерилизацию стеклянной посуды проводят в:

- а) аппарат Кротова
- б) анаэростат
- в) сухожаровой шкаф
- г) термостат
- д) автоклав

14. Культивирование микроорганизмов проводят в:

- а) аппарат Кротова
- б) анаэростат
- в) сухожаровой шкаф
- г) термостат
- д) автоклав

Лабораторная работа №2

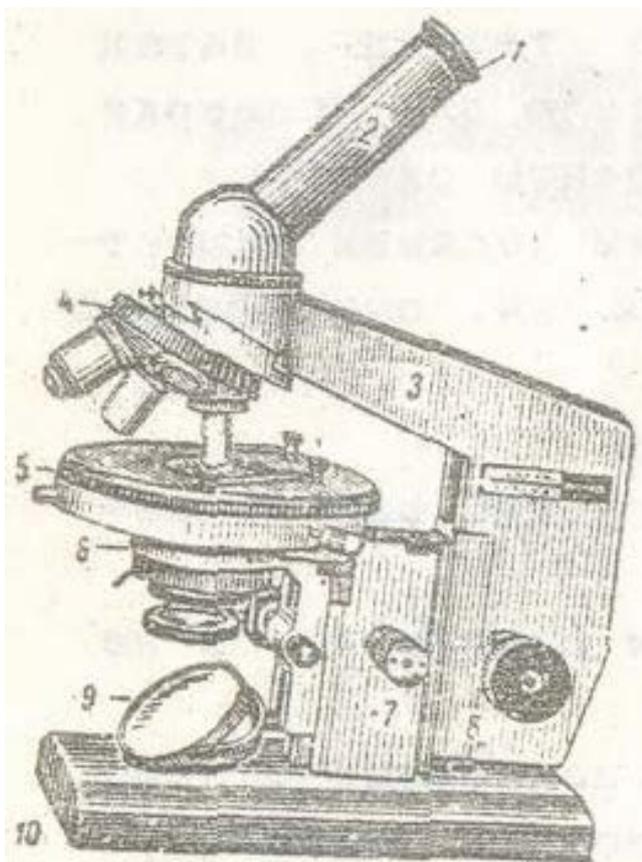
Тема: «Устройство микроскопа»

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

Схема светового биологического микроскопа представлена на рис. 1.

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

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



- 1 – окуляр, 2 – тубус,
- 3 – тубусодержатель,
- 4 – револьвер объективов,
- 5 – предметный столик,
- 6 – конденсор,
- 7 – микрометрический винт, 8 – макрометрический винт
- 9 – осветитель, 10 - основание

Рис. 1 Схема устройства светового биологического микроскопа

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

Рукоятки грубой и тонкой фокусировки (макро- и микрометрические винты) служат для перемещения тубуса вверх и вниз, что позволяет установить его на необходимом расстоянии от препарата. При вращении винтов по часовой стрелке тубус опускается, а при вращении против часовой стрелки – поднимается. При вращении макрометрического винта объектив ориентировочно устанавливается на фокус, т.е. на то расстояние от препарата, при котором он делается видимым. Оборот макрометрического винта позволяет переместить тубус на 20 мм. Микрометрический винт служит для точной установки на фокус. Полный оборот его перемещает тубус на 0,1 мм.

С микровинтом следует обращаться очень осторожно: допустимо вращение микровинта не более чем на 180°C в ту или иную сторону.

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

Окуляр (от лат. *oculus* – глаз) состоит из двух плосковыпуклых линз, заключенных в общую металлическую оправу. Верхняя линза – глазная (увеличивающая), нижняя – собирающая. Расстояние между линзами равно полусумме их фокусного расстояния. У окуляров с большим увеличением фокус короче, поэтому меньше и длина окуляра. Между линзами имеется диафрагма, ограничивающая поле зрения и задерживающая краевые лучи света. Отечественные микроскопы снабжены тремя сменными окулярами, увеличение которых указано на корпусе окуляра ($\times 7$; $\times 10$; $\times 15$).

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

В гнезда револьверного устройства ввинчиваются четыре объектива, увеличение которых указано на корпусе объектива ($\times 8$; $\times 20$; $\times 40$; $\times 90$ или 100). Каждый объектив характеризуется своим фокусным расстоянием (расстоянием между предметным стеклом и фронтальной линзой): объектив $\times 8$ имеет фокусное расстояние около 9 мм, объектив $\times 40$ – 0,65 мм, объектив $\times 90$ – 0,15 мм.

Объективы подразделяются на *сухие* и *иммерсионные*.

При работе с *сухими объективами* ($\times 8$, $\times 20$, $\times 40$) между фронтальной линзой и препаратом находится воздух. В этом случае лучи света проходят среды с различными показателями преломления (покровное стекло, воздух), часть их отклоняется и не попадает в объектив.

При работе с *иммерсионными объективами* ($\times 90$ или $\times 100$) для устранения светорассеяния расстояние между фронтальной линзой объектива и препаратом заполняют иммерсионным (кедровым) маслом, показатель преломления лучей света которого близок к показателю преломления лучей света, проходящего через стекло.

Общее увеличение микроскопа определяется как произведение увеличения объектива на увеличение окуляра. Например, если в работе используют окуляр $\times 15$, а под тубусом находится объектив $\times 90$, то увеличение рассматриваемого с помощью микроскопа объекта составит $\times 1350$.

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

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

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

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

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

Правила работы с микроскопом

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

Выполните задания

Задание №1

Изучите устройство микроскопа. Перечислите и запишите в тетрадь для практических работ детали микроскопа, составляющие:

- а) оптическую часть;
- б) механическую часть.

Задание №2

Заполните таблицу «Устройство микроскопа».

Часть микроскопа	Основная функция

Задание №3

Подсчитайте и запишите увеличение микроскопа, который использовался в работе: увеличение микроскопа равно произведению увеличения объектива на увеличение окуляра.

Задание №4

Выберите один правильный ответ в тестовом контроле «Устройство микроскопа»:

1. К механической части микроскопа относят:
 - а) тубус; б) окуляр; в) объектив
2. К оптической части микроскопа относят:
 - а) тубус; б) макровинт; в) окуляр
3. К осветительному устройству микроскопа относят:

- а) зеркало; б) тубус; в) объектив
4. Для рассматривания объектов, не видимых простым глазом, используют:
- а) лупу; б) бинокль; в) микроскоп
5. Окуляр является:
- а) механической частью; б) оптической частью; в) осветительным устройством

Лабораторная работа 3 Стерилизация. Методы и средства стерилизации.

Задание:

1. Ознакомиться с методами стерилизации, применяемыми в микробиологии.
2. Освоить методы подготовки посуды для стерилизации.

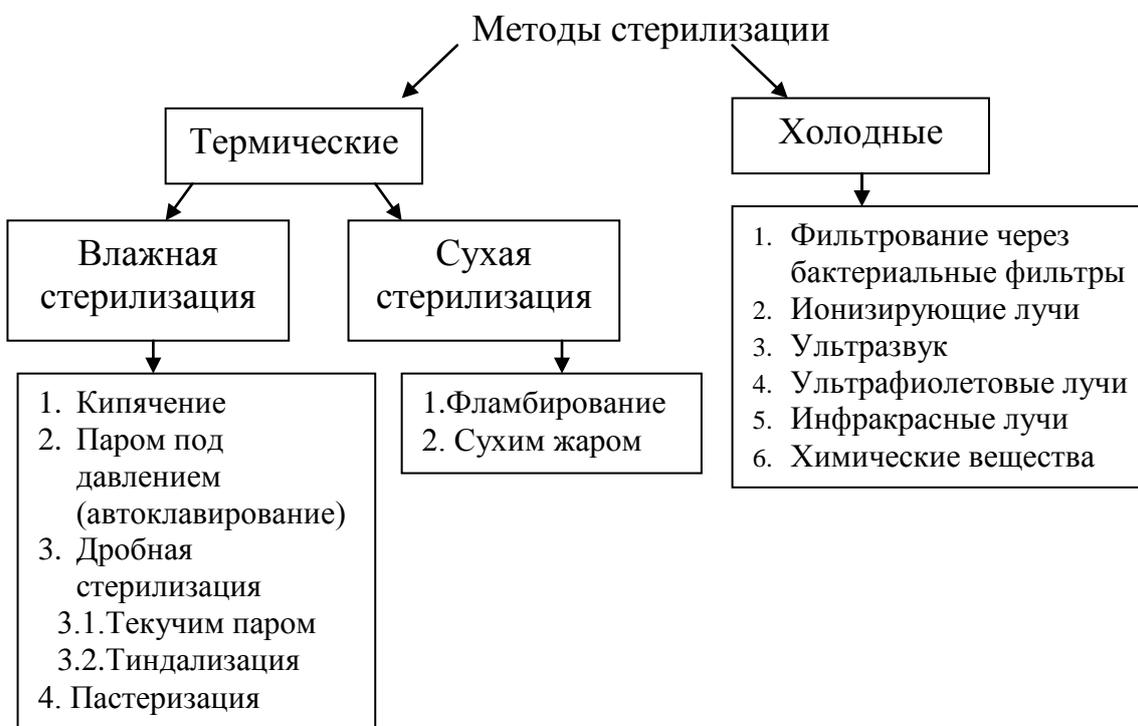
Стерилизацией (от греч. *sterilis* - бесплодный) называют полное уничтожение микроорганизмов в питательных средах, на посуде и других объектах, т. е. уничтожение всего живого, способного размножаться.

Стерилизация должна обеспечивать уничтожение всей микрофлоры (патогенной и непатогенной) на данном объекте.

Стерилизацию проводят различными методами, основными из которых является термическое воздействие. К разновидностям термической стерилизации относят обжигание в пламени горелки (фламбирование), стерилизацию сухим жаром, кипячение, воздействие паром под давлением (автоклавирование), дробную стерилизацию (воздействие текучим паром, тиндализация).

В отдельных случаях применяют механическую стерилизацию, которая осуществляется фильтрованием материала через мелкопористые бактериальные фильтры. Кроме того, применяются химические методы стерилизации. В последнее время в медицине и пищевой промышленности для стерилизации используют обработку объекта ультрафиолетовыми лучами, ультразвуком, ионизацией и др. (схема 1).

Схема 1



1. Термическая стерилизация

Стерилизация кипячением. Стерилизовать кипячением можно металлические инструменты, шприцы, иглы в течение 30-40 мин. Кипячение убивает вегетативные формы

бактерий и споры некоторых бацилл (например *Bac. cereus*). Однако даже весьма продолжительное кипячение не обеспечивает гибели спор ряда анаэробных бацилл: *Cl. botulinum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. perfringens*, выдерживающих кипячение более 1-3 час.

Стерилизация паром под давлением (автоклавирование) - самый эффективный в бактериологической практике способ стерилизации, так как с его помощью быстро достигается гибель не только вегетативных, но и споровых форм наиболее устойчивых бацилл. Губительное действие высокой температуры обусловливается повреждением коллоидного состояния плазмы, денатурацией белка с последующей коагуляцией его, а также нарушением ферментных систем микроорганизмов. Этот способ стерилизации основан на том, что образующийся при кипячении воды пар не выходит наружу, а скапливаясь в замкнутом пространстве, повышает давление. Горячий водяной пар быстро проникает в живые клетки микробов и вызывает их гибель. Действие горячего пара будет эффективнее при увеличении давления, так как при этом повышается температура пара.

Стерилизация насыщенным паром под давлением проводится, в автоклавах. Впервые он введен в бактериологическую практику русским врачом Гейденрейхом и представляет собой массивный металлический двухсменный котел с герметически закрывающейся крышкой. Автоклав подогревается электронагревательным прибором. Образующийся при кипении пар проходит между стенками автоклава и через отверстия в верхней части внутренней стенки попадает во внутреннее пространство автоклава, куда помещаются стерилизуемые предметы, и вытесняет воздух. При постоянном подогревании воды непрерывно образующийся пар повышает давление внутри котла выше атмосферного, что повышает температуру кипения воды. За повышением давления следят по показаниям манометра, соединенного с внутренним пространством автоклава (манометр показывает избыточное, выше атмосферного, давление). Манометр обязательно два раза в год должен проверяться специальной организацией - котлонадзором.

Во избежание разрыва автоклава от высокого давления автоклав снабжают предохранительным клапаном, который регулируется на определенное давление и автоматически открывается, выбрасывая излишки пара наружу (в атмосферу), при повышении давления внутри автоклава выше того, на которое он отрегулирован.

Стерилизацию материала в автоклаве чаще проводят при 121 °С (0,1 МПа) в течение 20-30 мин., при этом погибают вегетативные и споровые формы микробов.

В автоклаве можно стерилизовать посуду, инструменты, питательные среды (кроме сывороточных, белковых и углеводных сред), культуры микроорганизмов и т. д.

Стерилизация текучим паром в аппарате Коха. Текучим паром стерилизуют питательные среды, содержащие вещества, разрушающиеся при стерилизации в автоклаве при 121°С (желатин, молоко, углеводные среды).

Стерилизацию текучим паром проводят в течение трех дней подряд по 30-60 мин. ежедневно. В промежутках стерилизуемый объект выдерживают при комнатной температуре.

В основу метода дробной стерилизации положен следующий принцип: при нагревании до 100°С в течение 30-60 мин. погибают все вегетативные формы микроорганизмов, но споры остаются и в промежутке между стерилизацией прорастают в вегетативную форму. Через сутки снова стерилизуют. Обычно после третьей стерилизации достигается полное обеспложивание объекта.

Стерилизацию текучим паром проводят в аппарате Коха или в автоклаве. Крышку автоклава не привинчивают, кран пароотводной трубки оставляют открытым, пар свободно выделяется наружу.

Тиндализация - представляет собой дробную стерилизацию при низкой температуре, предложенную Тиндалем для объектов, не переносящих температуры 100°С (среды с кровяной сывороткой, яичным белком). Их подвергают нагреванию в течение 5-6 дней подряд при температуре 56-58°С по 1 часу ежедневно (в первый день - в течение 2-х часов).

В промежутках между прогреванием стерилизуемая жидкость хранится в термостате. При этом оставшиеся в живых споры прорастают в вегетативные клетки, которые погибают при последующем нагревании. Тиндализацию проводят в специальных приборах с терморегулятором или на водяных банях.

Пастеризация - это термическая обработка жидких и полужидких продуктов при температуре ниже 100°C с последующим быстрым охлаждением до температуры 6-9°C.

При пастеризации погибают неспоровые микроорганизмы и снижается общая бактериальная загрязненность продукта, повышается его стойкость. Охлаждение, следующее за нагреванием, предотвращает развитие микроорганизмов, не убитых термической обработкой.

Пастеризацию применяют для обеззараживания молока, вин, икры, фруктовых соков и других продуктов.

Существует три режима пастеризации: длительная - при температуре 65 °С в течение 30 мин.; кратковременная (быстрая) - при 75°C, экспозиция от нескольких секунд до 5 мин.; молниеносная - при 90-93°C без выдержки.

2. Сухая стерилизация

Прокаливание (фламбирование). Прокаливать можно непосредственно перед употреблением бактериологические петли, иглы, шпатели, мелкие металлические предметы (ножницы, пинцеты и т. д.), предметные стекла, стеклянные палочки и прочее.

Стерилизация сухим жаром (сухим нагретым воздухом) производится в особых аппаратах - сушильных шкафах. Стерилизуют сухим жаром стеклянную посуду, пипетки, чашки Петри.

Посуду перед стерилизацией высушивают и заворачивают в бумагу, пробирки и колбы закрывают ватными пробками. Это делается для того, чтобы после стерилизации их не обсеменять (не загрязнять) микробами из воздуха. Режим стерилизации сухим жаром при температуре +150°C - в течение 2-х часов; при температуре плюс 160-170°C - в течение 1-1,5 часов. По окончании стерилизации печь открывают только после того, как она остынет (в противном случае вследствие резкой разницы температур стеклянные предметы могут лопнуть).

3. Холодная стерилизация

Стерилизация фильтрованием. Применяется для стерилизации жидкостей в тех случаях, когда их нельзя подвергнуть нагреванию (сыворотка крови, кровь, ряд лекарственных веществ). Проводится путем фильтрации жидкостей через специальные фильтровальные приборы. Фильтровальные приборы имеют настолько мелкие поры, что на своей поверхности задерживают все механические, взвешенные в жидкости частицы, в том числе и микроорганизмы.

Ионизирующие излучения. Коротковолновые излучения, обладающие энергией, способной выбить электрон из атома, называются ионизирующими. К ионизирующим лучам относятся γ -лучи. Ионизирующие лучи в больших дозах (1000 Дж/кг) вызывают в 90-97% случаях гибель бактерий, а дозы 7-10 тыс. Дж/кг приводит к полному отмиранию микробов. Излучения применяют для стерилизации лечебных препаратов и пищевых продуктов.

Стерилизация с помощью ультразвуковых волн. Ультразвук - это механические колебания с частотами выше 20000 колебаний в секунду. Ультразвуки способны распространяться в твердой, жидкой и газообразной средах. При этом в озвучиваемой среде они вызывают ряд физических, химических, биологических явлений. Под влиянием определенной интенсивности ультразвуковых волн инактивируются ферменты, токсины, вирусы. Бактериальная клетка погибает под влиянием ультразвука в связи с разрывом оболочки.

Ультразвук может применяться для стерилизации воды, молока и различных продуктов. Летальное действие УЗ-волн на бактерии и вирусы начинает проявляться при озвучивании среды с частотой колебаний около 100 000 герц.

Инфракрасные лучи. Эти излучения нагревают стерилизуемый объект быстро и по всей толщине, в отличие от нагревания паром, когда прогревание идет с поверхности внутрь. Скорость отмирания микробов зависит от температуры нагревания. Тепло, получаемое от инфракрасных лучей, может использоваться для обезвоживания, варки, копчения, вытапливания жира, размораживания.

Ультрафиолетовые лучи применяют для стерилизации воздуха в холодильниках и цехах предприятий, используют для стерилизации воды и напитков, рассолов, поверхностей

сыров, для облучения молока с целью обогащения его витаминами группы «Д».

Химические методы стерилизации (консервирование) имеют ограниченное применение. В лабораторной практике консервируют питательные среды хлороформом, толуолом, иногда эфиром. Для освобождения от консерванта питательные среды нагревают на водяной бане при 56°C.

Химические методы стерилизации (*дезинфекция*) – сильное снижение численности – как правило, под воздействием химических агентов. Химическая дезинфекция связана с применением сильных окисляющих агентов, таких, как хлор, озон, перекись водорода, спирты, альдегиды, фенолы.

Задание

Отразите в тетради схему 1 и заполните таблицу.

Виды стерилизации	Краткое описание
1. Кипячение	
2. Паром под давлением (автоклавирование)	
3. Пастеризация	
4. Дробная стерилизация Текучим паром Гиндализация	
5. Фламбирование	
6. Сухим жаром	
7. Фильтрование через бактериальные фильтры	
8. Ионизирующие лучи	
9. Ультразвук	
10. Ультрафиолетовые лучи	
11. Инфракрасные лучи	
12. Химические вещества	

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 4

Тема: «Морфология микроорганизмов»

Цель: изучить морфологию бактерий.

Выполните в задания:

Задание №1

Используя схему «Строение бактериальной клетки», изучите, зарисуйте и подпишите основные части бактериальной клетки.

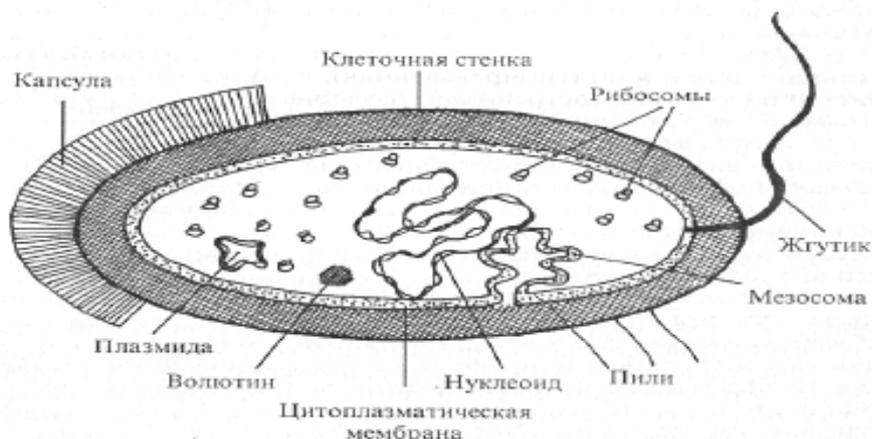


Рис.2. Строение бактериальной клетки

Задание 2. «Классификация микроорганизмов микроорганизмов»

Задание: Необходимо выбрать любой вариант (бактерии, плесневые грибы, дрожжи или вирусы), внимательно прочитать возможные ответы и указать номера (коды) правильных ответов, характеризующих выбранный вариант:

Варианты	Возможные варианты
<p>Что характерно для:</p> <p>1. Бактерии</p> <p>2. Дрожжи</p> <p>3. Плесневые грибы</p> <p>4. Вирусы</p>	<p>1. Микроорганизмы, клетка которых не имеет дифференцированного ядра</p> <p>2. Микроорганизмы, размеры которых исчисляются в микрометрах</p> <p>3. Микроорганизмы, размеры которых исчисляются в нанометрах</p> <p>4. Микроорганизмы, большинство из которых способ превращать различные углеводы в этиловый спирт и углекислый газ, на чем основано их использование</p> <p>5. Микроорганизмы, способные при неблагоприятных условиях образовывать споры</p> <p>6. Микроорганизмы, способные легко проходить через бактериальные фильтры</p> <p>7. Микроорганизмы, способные размножаться как вегетативным, так и половым путем</p> <p>8. Микроорганизмы, клетка которых имеет одно или несколько дифференцированных ядер</p> <p>9. Микроорганизмы, способные образовывать на поверхности тем самым вызывать порчу пищевых продуктов</p> <p>10. Микроорганизмы, которые не имеют клеточной структуры.</p> <p>11. Микроорганизмы, способные к передвижению с помощью жгутиков.</p> <p>12. Микроорганизмы, имеющие извитые формы (вибрионы, спирохеты).</p> <p>13. Микроорганизмы, являющиеся внутриклеточными и размножающиеся только в живых клетках</p> <p>14. Микроорганизмы, имеющие наибольшую скорость размножения</p> <p>15. Микроорганизмы, среди которых встречается как одноклеточные, так и многоклеточные формы</p>

Задание №3

Подпишите в тетради отдельно бактерии кокковидных, палочковидных и извитой форм, используя рисунки.

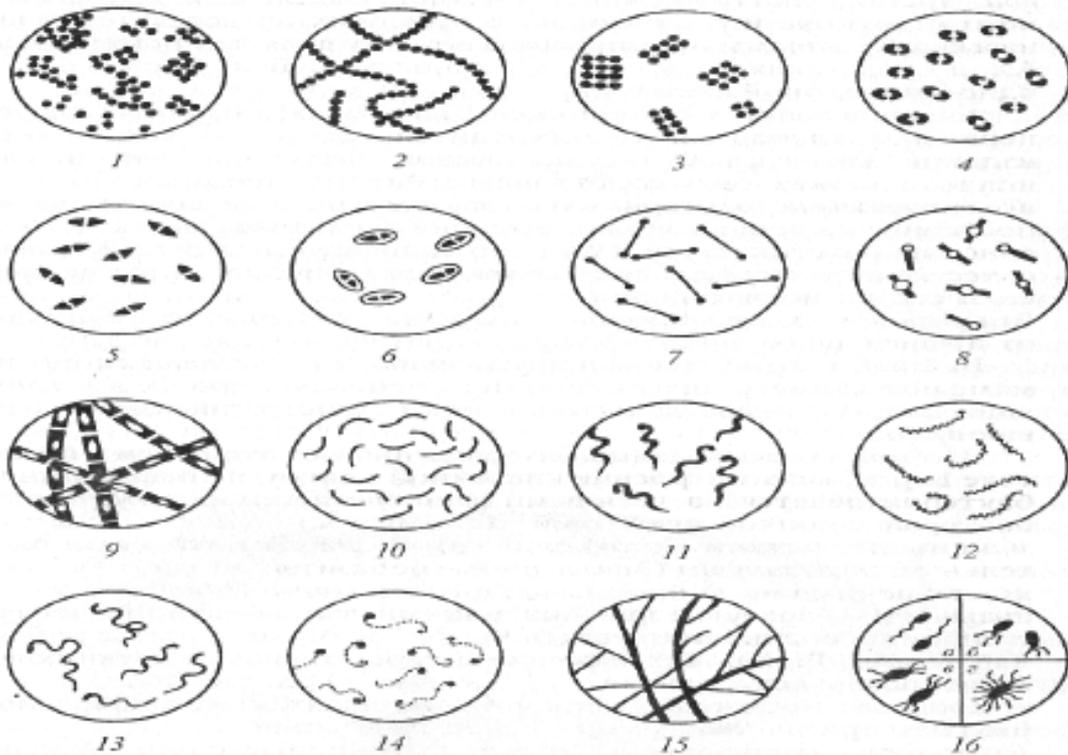


Рис.3.Разнообразие бактериальных форм.

1-стафилококки ; 2- стрептококки ; 3- сарцины ; 4- гонококки ; 5- пневмококки ; 6 – капсула пневмококков ; 7 – коринебактерии дифтерии ; 8- клостридии ; 9 – бациллы ; 10 – вибрионы ; 11-спириллы ; 12- трепонемы ; 13 – бореллии ; 14- лептоспиры ; 15- актиномицеты ; 16- расположение жгутиков : а- монотрих ; б – лопотрих ; в- амфитрих ; з – перитрих

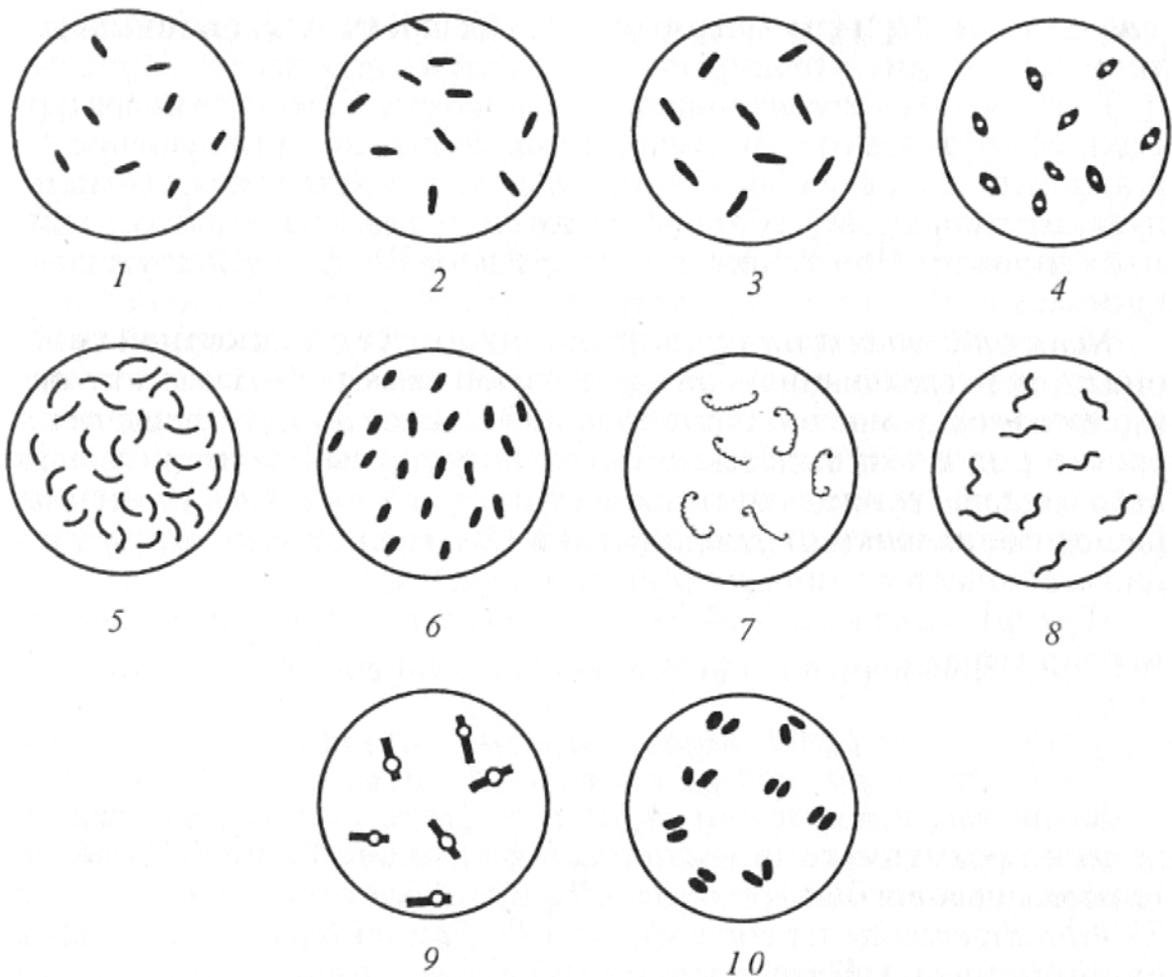


Рис. Бактерии – возбудители кишечных инфекций :
 1 – эшерихии ; 2 – шигеллы ; 3 – сальмонеллы ; 4 – иерсинии ; 5 – вибрионы ; 6 – бруцеллы ; 7 – лептоспиры ; 8 – кампилобактерии ; 9 – клостридии ботулизма ; 10 – листерии

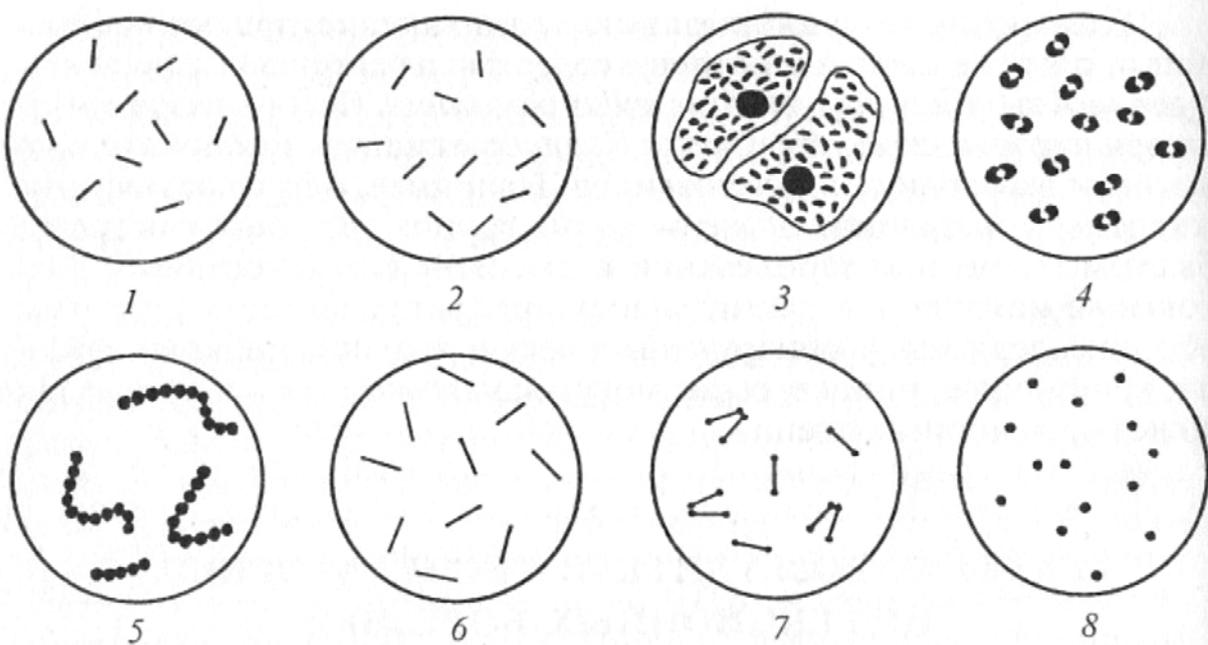


Рис.. Бактерии - возбудители инфекций дыхательных путей :

1 – бордетеллы ; 2- легионеллы ; 3 – хламидии в инфицированных клетках ; 4- менингококки ; 5 – стрептококки ; 6 – микобактерии туберкулеза ; 7 – коринебактерии дифтерия ; 8 – ммикоплазмы ;

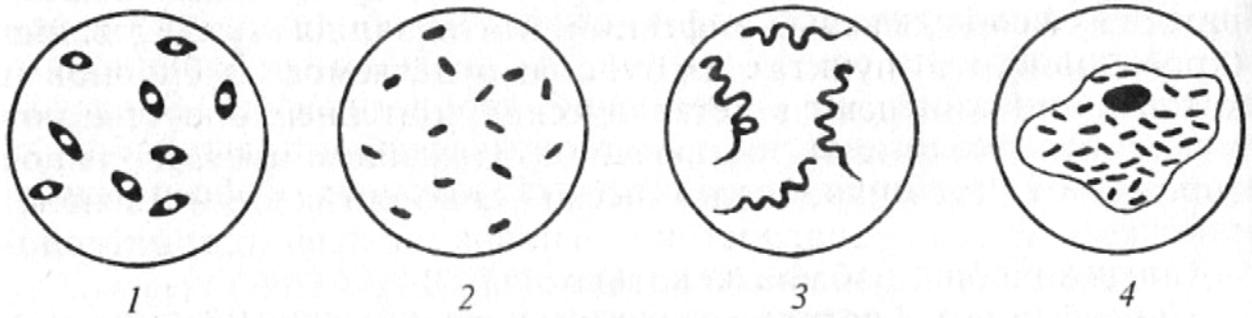


Рис . Бактерии – возбудители кровяных инфекций :

1 – возбудитель чумы ; 2 – возбудитель туляремии ; 3 – боррелии возвратно тифа ; 4- риккетсии в инфицированной клетке

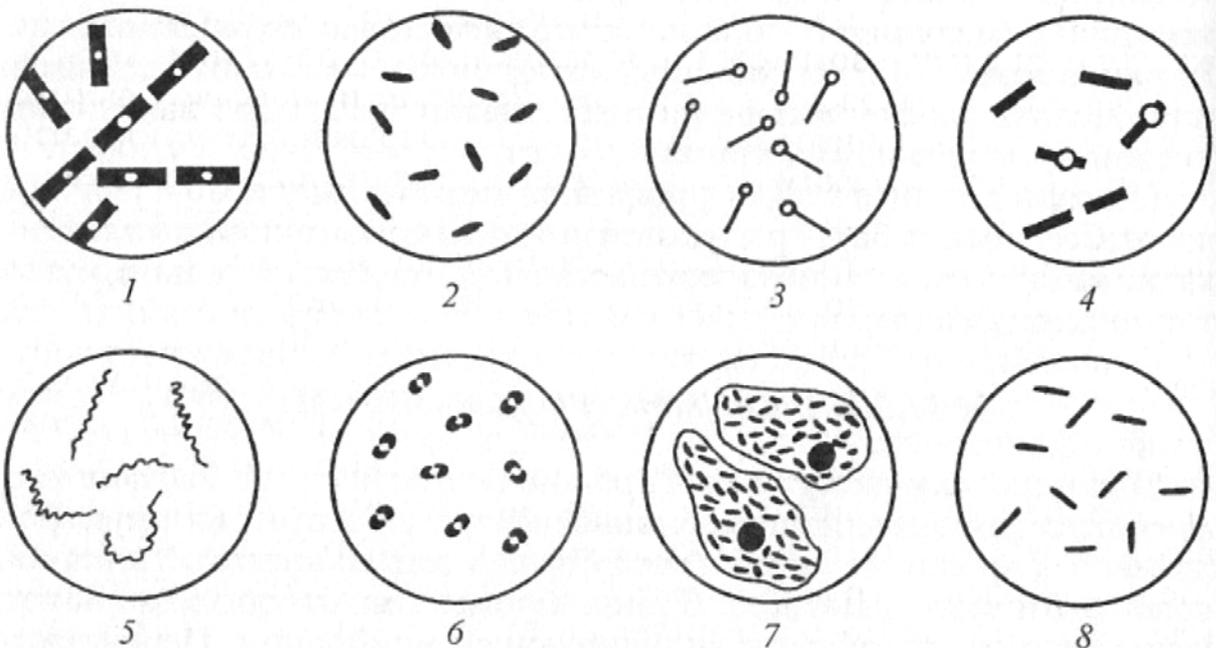


Рис. Бактерии – возбудители инфекций наружных покровов :

1- Возбудители сибирской язвы ; 2 – возбудители сапа ; 3 – клостридии столбняка ; 4 –клостридии газовой гангрены ; 5 – бледная трепонема ; 6 – гонококк ; 7 – возбудители трахомы ; 8 – гарднеллы

Задание №4

Выполните тестовый контроль «Морфология бактерий»

Выберите один правильный ответ:

1.К шаровидным бактериям относятся:

- А) вибрионы
- Б) сарцины
- В) диплобактерии
- Г) спириллы

2.К извитым бактериям относят:

- А) тетракокки
- Б) сарцины
- В) диплобактерии
- Г) спириллы

3.В виде “цепочки” располагаются:

- А) стафилококки
- Б) стрептококки

16

В) тетракокки

Г) менингококки

4.В виде “тюков” или “пакетов” располагаются:

- А) сарцины
- Б) микрококки
- В) стафилококки
- Г) стрептококки

5.Стафилококки располагаются в виде:

- А) пакетов
- Б) цепочек
- В) одиночных цепочек
- Г) “гроздьев винограда”

6.Споры образуют:

- А) возбудитель ботулизма
- Б) брюшнотифозная палочка
- В) кишечная палочка

Г) холерный вибрион

7. К заболеваниям, вызываемым кокками

относят:

А) ангину

Б) грипп

В) амебиоз

Г) вирусный гепатит

8. Укажите главный признак строения бактерий:

А) ядерное вещество не отделенное от цитоплазмы

Б) отсутствует оболочка

В) имеются митохондрии

Г) нет рибосом

9. Характеристика лоботрихий:

А) имеют один жгутик

Б) жгутики в виде пучков по обоим концам

В) жгутики в виде пучка на одном конце бактерии

Г) жгутики по периметру

10. По типу дыхания бактерии делятся:

А) облигатные анаэробы

Б) аутотрофы

В) гетеротрофы

Г) условно – патогенные

11. Клетка бактерии снаружи покрыта:

А) слизью

Б) капсулой

В) щетинками

12. Палочковидную форму имеют:

А) спириллы

Б) сарцины

В) бактерии

Г) спирохеты

13. К шаровидным бактериям относятся:

А) вибрионы

Б) стрептококки

В) диплобактерии

Г) спириллы

14. В виде “ виноградных гроздьев”

располагаются:

А) менингококки

Б) стрептококки

В) стафилококки

Г) тетракокки

15. Парно располагаются:

А) стафилококки

Б) сарцины

В) диплококки

Г) стрептококки

16. Споры образует:

А) возбудитель столбняка

Б) брюшнотифозная палочка

В) туберкулезная палочка

Г) холерный вибрион

17. По расположению жгутиков бактерии

делятся:

А) амфитрихий

Б) диплококки

В) аутотрофы

Г) гетеротрофы

18. Прокариоты – это организмы... :

А) клетки, которых не имеют оформленного ядра

Б) содержащие в клетках одно или несколько ядер

В) состоящие из одинаковых клеток и не имеющие ткани

Г) которые не имеют клеточного строения

19. Организмы, в клетках которых хромосома

замкнута в кольцо и называется нуклеомом:

А) гетеротрофы

Б) эукариоты

В) прокаротиоты

Г) автотрофы

Задание №4

Приготовьте мазок из выращенной культуры микроорганизмов, окрасьте его и рассмотрите под микроскопом.

Приготовление мазка:

1. Небольшое количество воды нанести на предметное стекло.

2. Затем в неё внести культуру микроорганизмов и тщательно растереть.

3. Мазок зафиксировать путем трехкратного проведения над пламенем горелки.

4. Мазок окрасить любым из красителей (сафранин или генцианвиолет).

5. Промыть водой.

6. Высушить.

7. Рассмотреть препарат под микроскопом.

Зарисуйте и опишите увиденное под микроскопом. Сделайте вывод.

Лабораторная работа № 5

Изучение культуральных свойств микроорганизмов

Цель работы: Освоение методики изучения свойств микроорганизмов и описание колоний микроорганизмов;

Культуральные свойства микроорганизмов устанавливаются по особенностям роста на питательных средах. Культуральные свойства определяют на плотных и жидких питательных средах. На поверхности плотных сред микроорганизмы могут расти в виде колоний, штриха или сплошного газона. Колонией называют изолированные скопления клеток одного вида, выросших из одной клетки. При росте в чашках Петри различают поверхностные, глубинные и донные колонии.

Колонии характеризуются по размеру, цвету, форме, поверхности, консистенции, прозрачности, изменению среды вокруг колоний, по форме края, структуре, характеру блеска, профилю.

На жидких питательных средах характер роста микроорганизмов менее разнообразен, чем на плотных средах. Различают следующие формы роста в жидких средах: помутнение, образование пленки на поверхности, пристеночный рост, придонный рост, изменение цвета, образование газа, запаха.

Физиологические свойства – отношение к кислороду, кардинальные температурные точки, ферментацию углеводов и т.д.

Приборы и реактивы:

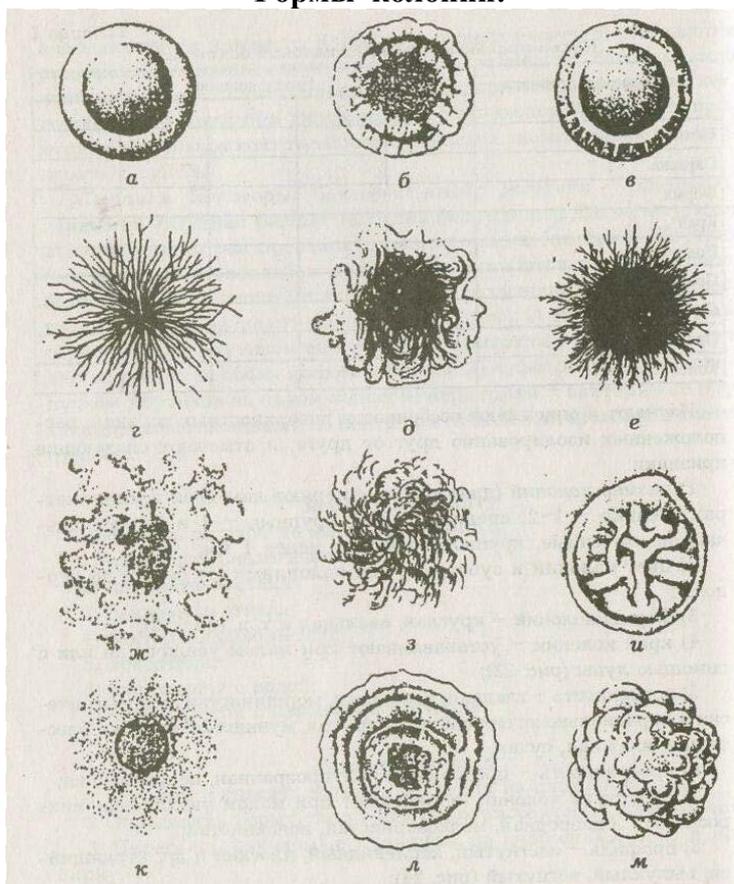
чашки Петри с выросшими колониями;

Описать колонии микроорганизмов на плотной питательной среде. Каждому студенту необходимо отобрать 2 разные колонии и описать их. Результаты занести в таблицу

Описание колонии

Цвет	Размер	
Цвет		
Форма		
Поверхность		
Консистенция		
Прозрачность		
Изменение среды вокруг колонии		
Край колонии		
Структура		
Характер блеска		
Профиль колонии		

Формы колоний:



a - круглая; *б* - круглая с фестончатым краем; *в* - круглая с валиком по краю; *г*, *д* - ризоидная; *е* - с ризоидным краем; *ж* - амёбовидная; *з* - нитевидная; *и* - складчатая; *к* - неправильная; *л* - концентрическая; *м* – сложная

Размер колоний (определяется её диаметром):

крупные – 4-5 мм в диаметре
средние – 2-4 мм в диаметре
мелкие – 1-2 мм в диаметре
карликовые (точечные) – менее 1 мм в диаметре

Цвет колоний:

может быть разнообразным (белый, жёлтый, зелёный, красный и др.) Он обусловлен пигментами, которые продуцируют микроорганизмы. Колонии, не образующие пигмент, называются бесцветными.

Поверхность колоний:

бывает гладкой, блестящей, шероховатой, морщинистой, матовой, сухой, влажной.

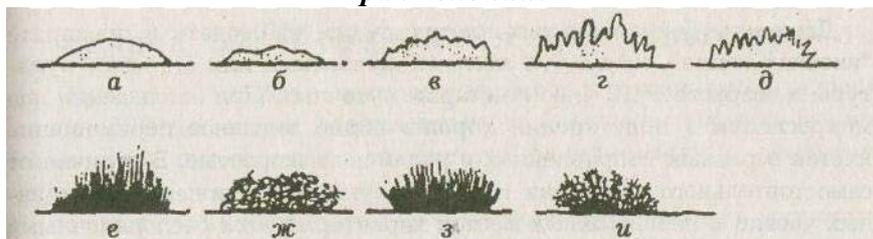
Консистенцию колонии, определяющую ее физическое состояние, исследуют посредством прикосновения или взятия из нее части материала бактериальной петлей.

По характеру консистенции колонии бывают:

- 1) пастообразные, легко снимающиеся и размазывающиеся по поверхности питательной среды, наподобие сливочного масла;
- 2) вязкие или слизистые, прилипающие и тянущиеся за петлей;
- 3) волокнистые или кожистые, плотные, снимающиеся с поверхности питательной среды в виде упругой пленки, соответствующей величине и форме колонии;
- 4) хрупкие, сухие, рассыпающиеся при прикосновении петли.

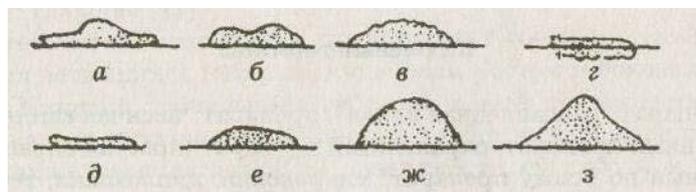
Прозрачность колоний определяется степенью прохождения через них света. Они бывают прозрачными, полупрозрачными и непрозрачными.

Края колоний:



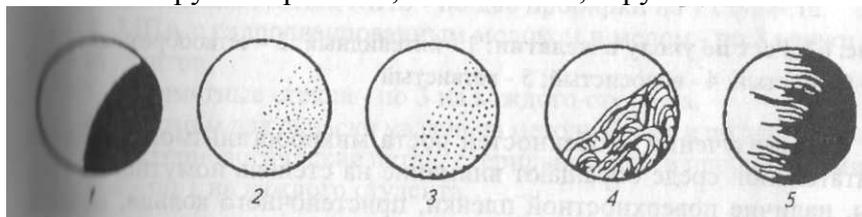
a - гладкий; *б* - волнистый; *в* - зубчатый; *z* - лопастный, *д* - неправильный; *e* - реснитчатый; *жс* - нитчатый; *з* - ворсинчатый; *и* - ветвистый

Профили колоний:



a - изогнутый; *б* - кратерообразный; *в* - бугристый; *z* - растущий в агар; *д* - плоский; *e* - выпуклый; *жс* - каплевидный; *з* - конусовидный

Структура колоний: бывает однородная (гомогенная), разнородная (гетерогенная), мелко и крупнозернистая, волокнистая, струйчатая



1-однородная, 2-мелкозернистая, 3-крупнозернистая, 4-струйчатая, 5-волокнистая

Лабораторная работа 6

"Спиртовое и маслянокислое брожения"

Спиртовым брожением называется процесс превращения сахара микроорганизмами в этиловый спирт и углекислый газ. Спиртовое брожение осуществляют дрожжи в основном рода *Saccharomyces*, представители муконовых грибов (*Mucor mucedo*, *Mucor oryzae*), бактерии *Sarcina ventriculi*. Однако практическое значение имеют только дрожжи.

Дрожжи встречаются на поверхности растений, плодов, ягод, зерна, в воздухе, почве. Это одноклеточные, неподвижные организмы диаметром 8-10 мкм (диаметр бактериальной клетки 0,5-0,7 мкм). Клетки их круглой, овальной или несколько удлиненной формы. Содержат хорошо заметное под микроскопом ядро. В клетках встречаются различные включения: капли жира и волютина, сильно преломляющие свет, гликоген, зерна белковых веществ.

Дрожжи размножаются обычно бесполом путем: почкованием (*Saccharomyces* и др.) или реже делением (*Schizosaccharomyces*), но могут размножаться и спорами. Последние образуются или без предварительного слияния двух клеток, или им предшествует половой

Материалы и оборудование: колбы на 250 мл с затвором Мейсля; дрожжи прессованные; пробирки; 20%-й раствор Na₂SO₃, йод кристаллический, метиленовый синий; предметные и покровные стекла; микроскоп.

Ход работы.

Для изучения спиртового брожения пользуются синтетической средой следующего состава: сахара - 15,0 г; пептон - 0,5 г; KН₂PO₄ - 0,3 г; MgSO₄ - 0,1 г.

К условиям, способствующим развитию дрожжей, но препятствующим развитию других микроорганизмов, можно отнести следующие:

- 1) высокую концентрацию сахара;
- 2) слегка кислую среду за счет KН₂PO₄;
- 3) анаэробные условия;
- 4) накопление в процессе опыта значительного количества спирта. Сумма этих факторов делает среду селективной для дрожжей.

По М. В. Федорову, опыт ставят так. 100 мл среды наливают в эрленмейеровскую или плоскодонную круглую колбу емкостью 250 мл и вносят туда кусочек прессованных дрожжей (0,5 г). Колбу закрывают каучуковой пробкой, в которую вставлен затвор Мейсля с каучуковым клапаном Бунзена. Затвор легко пропускает выделяющийся при брожении углекислый газ, но задерживает пары воды. На затвор надевается толстостенная каучуковая трубка, верхний конец ее закрыт стеклянной бусиной, а трубка имеет небольшой продольный надрез (клапан Бунзена). Колбу взвешивают на технических весах с точностью до 0,01 г и ставят в термостат при 37°C.

Определение углекислого газа (CO₂).

Углекислый газ, образующийся при брожении, определяют по разности массы колбы при постановке опыта и после его окончания. Конец брожения устанавливают по прекращению газообразования.

Брожение обычно продолжается 2-3 дня. Несмотря на то, что колбу взвешивают только на технических весах, учет углекислого газа получается достаточно точный, так как его в процессе брожения выделяется много (на долю CO₂ приходится почти 50% сброженного сахара):



В опыте среда содержит 15 г сахара. Из этого количества может выделиться около 7-7,5 г CO₂.

Расчет количеств образовавшегося спирта и сброженного сахара.

По массе выделившегося углекислого газа легко рассчитать количества образовавшегося спирта и сброженного сахара.

Например, образовалось 6 г CO₂.

$$\begin{array}{r} 88 - 92 \qquad \qquad 180 - 88 \\ 6 \text{ г} - X \qquad \qquad Y - 6 \text{ г} \end{array}$$

$$X = 6 \times 92/88 = 6,3 \text{ г спирта};$$

$$Y = 6 \times 180/88 = 12,3 \text{ г сброженного сахара.}$$

Определение интенсивности брожения.

Под интенсивностью брожения понимают количество сброженного сахара в процентах от исходного за определенный промежуток времени.

Если 100 мл среды содержат 15 г сахара, то 12,3 г сброшенного сахара составят:

$$15 - 100\%$$

12,3 - X

$X = 12,3 \cdot 100 = 82$, т.е. интенсивность брожения равна 82%.

Микроскопическое изучение дрожжей.

Познакомиться с морфологией дрожжей можно путем микроскопирования бродящей жидкости. Для этого стеклянной палочкой наносят каплю культуральной жидкости на предметное стекло, закрывают покровным стеклом и после нанесения капли кедрового масла микроскопируют с иммерсионной системой объектива.

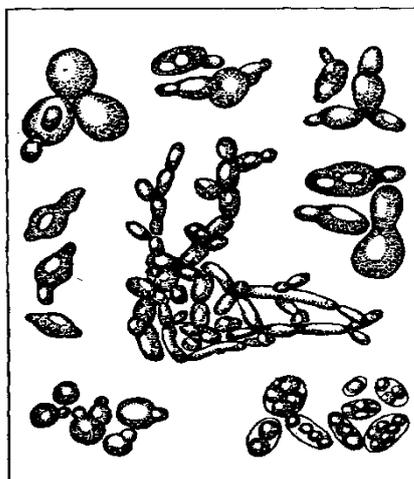


Рис. 1. Формы дрожжевых клеток

При микроскопировании препарата в раздавленной капле конденсор следует немного опустить. При микроскопировании препарата следует клетки зарисовать.

Выявление гликогена в клетках.

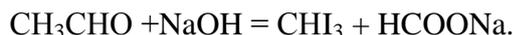
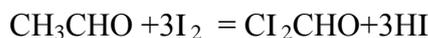
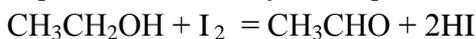
Гликоген (запасной полисахарид) обнаруживают при помощи прижизненного окрашивания дрожжевых клеток раствором йода. Гликоген окрашивается в красно-бурый цвет и является признаком зрелости дрожжей.

Качественные реакции на этиловый спирт.

Получение йодоформа (CHI_3). Реакция основана на том, что спирт с кристаллическим йодом в щелочной среде при нагревании до 60-70°C образует йодоформ.

Берут в пробирку 3-5 мл отгона, прибавляют столько же 20%-ного раствора Na_2SO_3 и около 0,1 г кристаллического йода в порошке. Смесь взбалтывают, нагревают на водяной бане при 60-70°C до полного растворения йода и его обесцвечивания. При охлаждении выпадают мелкие светло-желтые кристаллы йодоформа с характерным резким запахом.

Образование CHI_3 из спирта протекает по следующей реакции:



Из летучих органических соединений йодоформенную пробу дают уксусный альдегид и ацетон, в отсутствии которых в отгоне убеждаются с помощью фуксинсернистой кислоты или аммиачного раствора серебра. В присутствии альдегидов фуксинсернистая кислота краснеет, а аммиачный раствор серебра чернеет от выпадения металлического серебра.

Маслянокислое брожение представляет собой сложный процесс превращения сахара маслянокислыми бактериями в анаэробных условиях с образованием масляной кислоты, углекислого газа и водорода.

Собственно маслянокислое брожение осуществляется по уравнению:

Ход работы.

Опыт № 1

Для изучения маслянокислого брожения крахмала опыт ставят на среде с картофелем. Сырой неочищенный картофель нарезают мелкими кубиками, заполняют ими 1/3 объема высокой пробирки, добавляют немного мела (для нейтрализации масляной кислоты), заливают водопроводной водой на 2/3 и помещают в водяную баню при температуре 80°C на 10 - 15 минут (для пастеризации). Затем пробирки закрывают пробками и переносят в термостат с температурой 37°C. в этих условиях уже через 2-3 дня в жидкости обнаруживают бактерии маслянокислого брожения. В среду не вносят ни почвы, ни маслянокислых бактерий, так как на коже картофеля споры их всегда имеются.

Культура маслянокислых бактерий при этом является элективной. Для их преимущественного развития созданы анаэробные условия, беспоровые формы убиты предварительным нагреванием, добавка мела нейтрализует образующиеся кислоты и способствует развитию бактерий.

Через 2-3 дня картофель всплывает вверх вследствие бурно идущего газообразования.

По окончании брожения культуральную жидкость используют для микроскопирования маслянокислых бактерий и качественного определения продуктов брожения.

Опыт № 2

Для изучения маслянокислого брожения можно воспользоваться питательной средой, состоящей из рыбо-пептонного бульона с добавлением 3-5 % глюкозы. Чтобы в этой среде развивались преимущественно маслянокислые бактерии, следует создать в ней строго анаэробные условия и после заражения ее почвой нагреть до кипения. При нагревании споры маслянокислых бактерий остаются жизнеспособными, а попавшие с почвой неопарообразующие бактерии погибают.

Состав питательной среды: 0,75 г - рыбный бульон, 0,5 г - пептон; 0,25 г - NaCl; 2,5 г - глюкоза.

Опыт ставят следующим образом. В колбу Вюрца объемом 250-300 мл наливают 50 мл питательной среды, вносят примерно 0,5 г почвы для заражения и четверть чайной ложки мела для нейтрализации образующейся в процессе брожения масляной кислоты. На водяной бане нагревают колбу до кипения, не закрывая пробкой. Сняв колбу с огня, ее охлаждают, закрывают сверху каучуковой пробкой, а на боковой тубус надевают каучуковую трубку с зажимом. Каучуковую трубку зажимают винтовым зажимом и колбу ставят в термостат при температуре 30-37°C.

Микроскопирование маслянокислых бактерий. Питательную среду из колбы Вюрца или пробирки с картофелем берут пипеткой, погрузив ее в средний слой сброженной жидкости и, вынув ее из колбы, наносят каплю на предметное стекло. К накопительной культуре добавляют каплю раствора Люголя (I+KI) и покрывают покровным стеклом, на которое помещают каплю кедрового масла. При микроскопировании препарата обнаруживаются клетки *Clostridium butyricum*, *Clostridium butylicum*, *Clostridium pasteurianum* и других бактерий, имеющих подобную форму (рис.2).

Рис. 2. Маслянокислые бактерии

В клетках можно заметить овальные тельца, сильнее преломляющие свет. Это споры. В тех местах клетки, где содержится гранулеза, возникает синее окрашивание. Зарисовывают

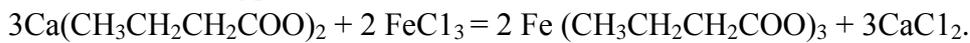


только окрашенные клетки, явно относящиеся к группе маслянокислых бактерий.

Качественные реакции на масляную кислоту.

Получение маслянокислого железа (реакция с FeCl_3). Нейтральные растворы маслянокислых солей при нагревании с FeCl_3 приобретают коричневое окрашивание вследствие образования маслянокислого железа.

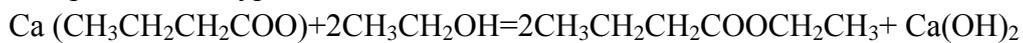
Реакция идет по уравнению:



Для проведения этой реакции в пробирку наливают 5 мл сброженной жидкости, добавляют 2 мл 5%-ного хлорного железа и нагревают на пламени. Раствор маслянокислого железа в отраженном свете приобретает буровато-коричневое окрашивание, а в проходящем свете - кроваво-красное.

Получение масляноэтилового эфира. К 5 мл культуральной жидкости в пробирке прибавляют 0,5 мл 96%-ного этилового спирта и 2 мл концентрированной серной кислоты. При взбалтывании и нагревании появляется характерный запах эфира (запах ананаса).

Реакция протекает по уравнению:



Вопросы для самопроверки.

1. Что такое брожение? Какое значение имеет брожение для бактерий?
2. Как протекает спиртовое брожение? Опишите химизм.
3. Какие группы микроорганизмов способны возбуждать спиртовое брожение? Опишите их.
4. Какое практическое значение имеет спиртовое брожение?
5. Перечислите условия, способствующие развитию дрожжей, но препятствующие развитию других микроорганизмов.
6. Как можно количественно определить образующийся углекислый газ при спиртовом брожении?
7. Что понимают под интенсивностью брожения?
8. Как можно определить запасной полисахарид - гликоген в дрожжевых клетках?
9. Опишите качественные реакции на этиловый спирт в спиртовом брожении.
10. Приведите уравнение и объясните химизм маслянокислого брожения?
11. Приведите характеристику возбудителей маслянокислого брожения?
12. На какие виды подразделяется маслянокислое брожение? По какому признаку?
13. Практическое значение маслянокислого брожения?
14. Опишите оптимальные условия для развития маслянокислых микроорганизмов?
15. Опишите качественные реакции на масляную кислоту в маслянокислом брожении.

Лабораторная работа 7

Определение качества рыбного и мясного сырья

Цель работы:

- Изучить микрофлору мяса (бактериоскопическим методом) и определить его качество.
- Изучить микрофлору рыбного сырья (бактериоскопическим методом) и определить его качество.

Материалы и оборудование: Микроскопы и все необходимое для микроскопирования; ножи, скальпели, окраска по Граму; рыба, мясо, фильтровальная бумага;

1. Рыба

Рыба как пищевой продукт играет важную роль. Другие обитающие в воде животные (ракушки, раки, головоногие моллюски), употребляемые в пищу, занимают незначительную

долю в рационе человека. Потребление рыбы покрывается до 9% за счет прибрежного и морского рыболовства, остальная часть приходится на озерно-речное рыболовство.

Температура тела рыбы зависит от окружающей среды. Поэтому и микрофлора кожи рыб зависит от воды, в которой они обитают: в теплых водах чаще встречаются мезофильные микроорганизмы (бациллы, коринебактерии, микрококки), в умеренных и холодных районах преобладают психрофильные микробы.

Болезнетворные для человека микробы могут находиться прежде всего во внутренних водных бассейнах и прибрежных морских водах. Причина в том, что в водоемы часто сбрасывают неочищенные сточные воды, в которых могут быть бактерии группы кишечных палочек, энтерококки, сальмонеллы и шигеллы. В воде может быть и *Cl.botulinum*, который был обнаружен на морском дне многих водоемов.

Замораживание не обеспечивает полного уничтожения микробов.

Мышечная ткань и мышечный сок свежельовленной рыбы считаются стерильными. Значительные количества бактерий были обнаружены в покровной слизистой оболочке, на наружных жабрах и в желудочно-кишечном тракте: от $1 \cdot 10^3$ до $1 \cdot 10^6$ КОЕ на 1 см^2 поверхности рыбы. Состав и количество микроорганизмов на поверхности рыбы часто зависит и от вида рыбы, а состав микрофлоры кишечника является примерно постоянным.

На поверхности рыб обитают бактерии следующих родов: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Corinebacterium*. Иногда встречаются дрожжи родов *Torulopsis*, *Candida*, *Rodotorula*, *Pichia*, *Cryptococcus*.

Анаэробные микроорганизмы встречаются только в желудочно-кишечном тракте.

Определение количества микробов в мясе рыбы не является единственным методом оценки ее свежести. Количество микробов $8 \cdot 10^9$ КОЕ/г в мышечной ткани рассматривается как граница пригодности рыбы для питания.

Методика проведения работы:

Качество свежей, охлажденной и мороженой рыбы и морских беспозвоночных контролируют визуально при поступлении их на рыбообработывающее предприятие и ежедневно.

Если доброкачественность рыбного сырья вызывает сомнение, то для объективной оценки проводят исследование мазков-отпечатков.

1.1. Исследование микрофлоры поверхности рыбного сырья

Для этого кожу рыбы посередине спины или ближе к голове освобождают от чешуи и прижигают раскаленным скальпелем, затем стерильным скальпелем вырезают кусочки мяса рыбы площадью около $1,5 \text{ см}^2$ и толщиной 1,5 - 2,0 мм. Кусочком мяса делают отпечаток на стерильном предметном стекле. К влажной поверхности исследуемого сырья прикладывают стерильное предметное стекло и прижимают на 1–3 мин. Затем стекло осторожной снимают, подсушивают, готовят фиксированный препарат (отпечаток мышечной ткани фиксируют, проводя 3 раза над пламенем горелки) и окрашивают по Граму. Готовый мазок просматривают, подсчитывают все микроорганизмы в десяти полях зрения (объектив $\times 90$ с иммерсией). В поле зрения микроскопа в мазке-отпечатке ткани рыбы, пригодной к употреблению, должно содержаться не более 10 клеток микроорганизмов (микро- и диплококков).

В тетрадах отмечают наличие микробов, окраску и форму:

- отсутствие микробных тел в препаратах;
- единичные микроорганизмы в препарате;
- единичные микроорганизмы в поле зрения;
- множество микроорганизмов в поле зрения.

Рыба считается доброкачественной, если в ней не содержатся микроорганизмы или в поле зрения встречаются единичные грамположительные бактерии.

В недоброкачественной рыбе с резким неприятным запахом увеличивается общее число микроорганизмов и процентное содержание грамотрицательных бактерий, уменьшается удельный вес кокковых форм.

2. Мясо

Мясо здорового скота можно считать практически свободным от микроорганизмов. Мясо павших больных и переутомленных животных содержит аэробные и анаэробные микроорганизмы.

Бактерии, попавшие на поверхность мяса, постепенно проникают вглубь него. Скорость проникновения зависит от температуры окружающей среды и вида микроорганизмов. В мясо, охлажденное до 2-4 °С, бактерии проникают через 30 дней в среднем на глубину 1 см. Проникновению микроорганизмов препятствует образующаяся в результате подсыхания мяса корочка. При хорошей корочке туша может храниться при 0 °С около 8 недель.

После убоя скота происходят изменения в мышечной ткани, наступает период созревания мяса, характеризующийся сложными физико-химическими процессами. При распаде гликогена в мышечной ткани накапливается молочная кислота, а в результате распада АТФ - фосфорная кислота. Для завершения созревания мяса требуется обычно несколько дней.

Если мясо хранить при температурах, благоприятных для развития микроорганизмов, в нем начнутся микробиологические процессы. Преобладающей микрофлорой в гниющем мясе становятся гнилостные палочки. Примерно через 3-4 сут в глубине мяса начинают размножаться и анаэробы (*Clostridium perfringens*, *C. sporogenes* и др.). Даже в мясе клинически здоровых животных иногда обнаруживают болезнетворные микроорганизмы, которые вызывают мясные отравления (пищевые токсикоинфекции). Часть их содержится в кишечнике животных и в момент убоя.

По степени свежести мясо подразделяют на доброкачественное, мясо сомнительной свежести и мясо, непригодное в пищу.

Доброкачественное мясо (свежее) имеет сухую корочку бледно-розового или бледно-красного цвета. На разрезе оно плотное, эластичное, ямка после надавливания быстро исчезает.

Несвежее мясо покрыто плотной темно-красной или ослизненной корочкой. Консистенция его мягкая, несколько дряблая, образующаяся при надавливании пальцем ямка не заполняется. Запах неприятный, гнилостный. Такое мясо используют только по указанию ветеринарно-санитарного надзора.

Если поверхность испорченного мяса ослизненная, липкая, на разрезе оно зеленого цвета, консистенция мяса дряблая, мажущаяся, жир слизистый, с прогорклым запахом, то его бракуют, это *непригодное в пищу* мясо.

1.1. Исследование микрофлоры поверхности мяса

Для приготовления мазка-отпечатка с поверхности мяса стерильными ножницами вырезают кусочек весом 0,5-1 г, прикладывают его срезанной стороной к поверхности обезжиренного профлампированного предметного стекла. Чтобы сделать мазки-отпечатки из глубинных слоев, поверхность мяса прижигают нагретым шпателем, стерильным ножом делают надрез и из глубины берут небольшой кусочек (0,5-1 г), который прикладывают к профлампированному стеклу.

Препараты подсушивают на воздухе, фиксируют на пламени и окрашивают по Граму, а затем микроскопируют и подсчитывают количество микроорганизмов в поле зрения, отмечая их форму.

Мазок-отпечаток из свежего мяса обычно окрашивается плохо. Если он получен с поверхностного слоя мяса, то в поле зрения встречаются единичные палочки и кокки. В препаратах из глубинных слоев они или отсутствуют, или встречаются не во всех полях зрения.

Мазок-отпечаток из мяса подозрительной свежести окрашивается удовлетворительно. При просмотре в поле зрения обнаруживают несколько десятков микроорганизмов. Особенно много их в мазке с поверхностного слоя. Мазок-отпечаток из испорченного мяса окрашивается хорошо. В поле зрения препаратов как с поверхностных, так и из глубинных слоев встречается в среднем более 30 микроорганизмов, среди которых преобладают палочки.

При разложении мяса кокки в отпечатках почти отсутствуют и все поле зрения усеяно палочками. Среди гнилостных микроорганизмов в мясе преобладают микрококки, кишечная

палочка, флуоресцирующие бактерии, споровые формы.

Характеристика отпечатка для свежего мяса – микрофлора не обнаруживается или видны единичные экземпляры кокков, дрожжей, палочек в поле зрения препарата. Отсутствуют остатки разложившейся ткани мяса.

Характеристика отпечатка из мяса сомнительной свежести – 20-30 кокков или несколько палочек в поле зрения. Видны следы распада мышечной ткани.

Характеристика отпечатка из мяса несвежего – в поле зрения много микроорганизмов, преобладают палочки гр. «-». Много распавшейся ткани мяса.

При микроскопировании необходимо отметить:

- наличие грамотрицательных бактерий, подозрительных в отношении тифо-паратифозной группы;
- соотношение кокковой и палочковидной флоры, что является показателем степени развития гнилостных процессов;
- общее количество бактерий в поле зрения микроскопа (среднее из 10 полей зрения).

Результаты бактериологического анализа мяса записывают в таблицу:

Органолептическая оценка	Количество микроорганизмов в одном поле зрения		Оценка качества мяса
	Кокки	Палочки	

Контрольные вопросы.

1. Условия хранения мяса и распространение микроорганизмов в результате хранения?
2. На какие виды делят мясо по степени свежести.
3. Как приготовить препарат из мяса?
4. Какие микроорганизмы преобладают в гниющем мясе?
5. Какая микрофлора характерна для свежего мяса?
6. От чего зависит микрофлора свежесловленной рыбы?
7. На каких участках тела рыбы встречается наибольшее число микроорганизмов?
8. Каким образом микроорганизмы попадают внутрь мышц рыбы?
9. В чём сущность бактериоскопического метода исследования рыбного сырья

Лабораторная работа 8

Микробиологическое исследование воздуха

В воздухе содержится разнообразная микрофлора, попадающая в него в основном из почвы. Количественный и качественный состав микроорганизмов в воздухе может быть довольно разнообразным. В воздухе могут присутствовать как сапрофитные, так и патогенные микроорганизмы. Среди микрофлоры наиболее часто встречаются спорообразующие палочки, пигментные бактерии (в основном кокки), грибы, дрожжи. Количество микроорганизмов находится в прямой зависимости от запыленности, влажности воздуха и других факторов. На пищевых предприятиях приходится считаться с загрязненностью воздуха микробами, особенно болезнетворными, как с фактором, способствующим увеличению обсемененности пищевых продуктов и возникновению потенциальной опасности здоровью людей.

В воздухе помещений на пищевых предприятиях, где проводят охлаждение, упаковка готового продукта, определяют количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов и количество спор плесневых грибов.

При анализе воздуха производственных помещений в зависимости от способа улавливания бактерий различают седиментационный, фильтрационный и аспирационный

методы исследования. Наиболее распространенными являются аспирационный и седиментационный методы. При помощи седиментационных методов можно получить общее представление о качественном и количественном составе микроорганизмов, встречающихся в воздухе. Аспирационные методы дают возможность более точно определить не только качественное, но и количественное содержание бактерий в определенном объеме воздуха.

При обследовании воздуха аспирационным методом используют аппарат Кротова. Воздух считается чистым, если при просасывании через аппарат 100 л воздуха на чашках с питательным агаром (при определении КМАФАнМ) вырастает не более 150 колоний и на суловом агаре — 15 колоний проросших спор плесневых грибов.

При седиментационном методе (метод осаждения) на различных участках обследуемого цеха размещают чашки Петри с питательным агаром и с суловым агаром или средой Сабуро и оставляют открытыми в течение 20 мин, затем чашки закрывают и инкубируют в первом случае при температуре 30⁰С в течение 72 ч, во втором — при 25⁰С в течение 5 сут. Воздух считается практически чистым, если на чашках с питательным агаром выросло до 200 колоний и на суловом агаре — до 20 колоний проросших спор плесневых грибов.

При повышенной обсемененности воздуха помещение следует обработать бактерицидными лампами после окончания или за 2 ч до начала работы.

Анализ воздуха производственных помещений, особенно отделений упаковки готовой продукции, желательно проводить не реже 1 раза в месяц и обязательно после ремонта и санитарной обработки.

Задание: Определить чистоту воздуха различных помещений (рыбного цеха, микробиологической лаборатории, технологической лаборатории).

Материалы и оборудование: чашки Петри с РПА, средой Сабуро. Термостат.

Ход работы.

1. Открыть чашки со средами на 20 мин, закрыть и поставить в соответствующие условия культивирования.
2. Через 72 ч произвести подсчёт КМАФАнМ на среде РПА и через 5 суток колонии плесневых грибов на Сабуро.
3. Сделать вывод о чистоте воздуха (нормативы в приложении 5, приведённые в соответствии с Инструкцией № 5319-91).

Контрольные вопросы

1. Какое значение имеет чистота воздуха для выпуска пищевой продукции?
2. Какие методы определения чистоты воздуха вы знаете?
3. По каким микробиологическим показателям нормируется чистота воздуха в закрытых помещениях?
4. Какие микроорганизмы чаще других встречаются в воздухе?
5. Рекомендации для очищения воздуха помещений.

Лабораторная работа № 9

Санитарно-микробиологическое исследование оборудования, рук и спецодежды персонала

С рабочих столов, весов, посуды, тары для хранения материала, оборудования, рук и спецодежды персонала, пробы отбирают методом смыва стерильными ватными тампонами, помещёнными в пробирки со стерильной жидкостью. При отборе проб с крупных плоских поверхностей (столы, халаты и т.д.) используют проволочную рамку-шаблон площадью 100 см². Перед взятием пробы шаблон фламбируют.

В день взятия смывов в каждую пробирку с тампоном наливают по 10 см³

стерильного 0,1%-ого водного раствора пептона, при этом тампон остаётся над жидкостью, не касаясь её. Перед взятием смыва тампон погружают в жидкость. Смоченным тампоном протирают поверхность площадью 100 см² во взаимоперпендикулярных направлениях. После этого тампон погружают в пробирку, встряхивают и дают отстояться 2-3 мин.

Смывы с оборудования инвентаря и тары делают перед началом работы и после санитарной обработки. В смывах с оборудования, инвентаря, тары определяют общую бактериальную обсемененность (ОМЧ), наличие кишечной палочки, при необходимости - плесени, дрожжи, *S.aureus*. Смывы исследуют без разведений.

Для определения ОМЧ 1 см³ смывной жидкости переносят в чашку Петри и заливают расплавленным и остуженным питательным агаром (метод глубинного посева). Инкубируют посев при (30±1)⁰С, 72 ч. Результат выражают в колониеобразующих единицах - КОЕ/см³ или КОЕ/см².

Для определения плесневых и дрожжевых грибов 1 см³ смывной жидкости высевают в среду Сабуро (глубинный метод посева) посева инкубируют при (24±1)⁰С 5 суток. Результаты выражают в КОЕ/см³ или КОЕ/см².

Для определения *S.aureus* 1 см³ смывной жидкости высевают в 5 см³ солевого бульона. Посев инкубируют при (36±1)⁰С, 24-48 ч подтверждение проводят по ГОСТ 10444.2 (см. лабораторную работу 2).

Для определения БГКП остаток смывной жидкости переносят в 5 см³ среды Кесслер или Кода. Посевы инкубируют при (36±1)⁰С, 24-48 ч. Подтверждение проводят по ГОСТ 30518 (см. лабораторную работу 2).

При взятии смывов с рук увлажненным стерильной жидкостью тампоном протирают ладонные поверхности обеих рук, сначала вдоль, потом поперёк, затем межпальцевые пространства. С перчаток берут смывы только со стороны ладоней. Для взятия смывов со спецодежды увлажненным тампоном протирают 4 площадки по 25 см² (2 площадки с верхней части одежды). Тампон погружают в 5 см³ среды Кесслер или Кода. Посевы инкубируют при (36±1)⁰С 24-48 ч. Подтверждение проводят по ГОСТ 30518 (см. лабораторную работу 2).

По санитарным нормам присутствие БГКП в смывах не допускается (см. приложение 5).

Задание: Провести санитарно-микробиологическое исследование смывов с оборудования лаборатории (со столов, весов, термостатов), рук, халатов.

Материалы и оборудование: спиртовки, пробирки со средами Кесслер, солевым бульоном, пептонной водой, среда Сабуро, РПА, ЭНДО, Среда Гисса с лактозой, микроскоп, термостат, стерильные тампоны на металлических стержнях.

Ход работы.

1. Приготовить пробирки со средами и тампонами.
2. Составить микробиологические схемы посевов.
3. Сделать смывы с оборудования на ОМЧ и БГКП.
4. Сделать смывы с халатов и рук на БГКП.
5. Поместить посева в термостат.
6. Проанализировать по микробиологической схемам посевов (см. лабораторную работу 2).
7. Сделать выводы.

Контрольные вопросы

1. Какое значение имеет санитарно-микробиологический контроль на пищевых производствах?

2. Что включает в себя санитарно-микробиологический контроль?
3. Каковы санитарные требования к технологическому оборудованию, инвентарю, таре, спецодежде, рукам?