

Учреждение образования  
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра биотехнологии и биоэкологии

---

---

# **МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ**

---

---

**Программа, методические указания,  
контрольные задания и лабораторные работы  
для студентов специальности 1-54 01 03  
«Физико-химические методы  
и приборы контроля качества продукции»  
заочной формы обучения**

Минск 2012

УДК 579.67:543.95:663.1(076.5)  
ББК [30.607+28.4+36.9]я73  
М59

Рассмотрены и рекомендованы к изданию редакционно-издательским советом университета

**Р е ц е н з е н т ы:**  
кафедра микробиологии  
Белорусского государственного университета  
(доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой  
*В. А. Прокулевич*; кандидат биологических наук,  
доцент *Р. А. Желдакова*);  
кандидат биологических наук, врач-бактериолог  
Республиканской референс лаборатории РНПЦ пульмонологии  
и фтизиатрии *О. П. Собещук*

**М59 Микробиологические методы контроля качества пищевых продуктов:** программа, метод. указания, контрольные задания и лаб. работы для студентов специальности 1-54 01 03 «Физико-химические методы и приборы контроля качества продукции» заочной формы обучения / сост. А. В. Игнатенко. – Минск : БГТУ, 2012. – 112 с.  
ISBN 978-985-530-161-6.

Представленные материалы являются частью учебно-методического комплекса «Микробиологические методы контроля качества пищевых продуктов», разработанного в соответствии с базовой программой для студентов физико-химических специальностей.

Лабораторные работы направлены на приобретение студентами практических навыков работы с микроорганизмами, а также на освоение классических и современных методов микробиологического анализа, контроля качества и безопасности пищевых продуктов.

УДК 579.67:543.95:663.1(076.5)  
ББК [30.607+28.4+36.9]я73

ISBN 978-985-530-161-6 © УО «Белорусский государственный технологический университет», 2012

---

---

# ОГЛАВЛЕНИЕ

---

---

<b>ПРЕДИСЛОВИЕ .....</b>	<b>5</b>
<b>1. ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ.....</b>	<b>6</b>
1.1. Назначение.....	6
1.2. Примерный тематический план дисциплины .....	10
1.3. Содержание учебного материала .....	11
1.3.1. Введение. Роль и значение микроорганизмов в при- роде и хозяйственной деятельности человека .....	11
1.3.2. Морфология, систематика и классификация мик- роорганизмов.....	11
1.3.3. Физиология и биохимия микроорганизмов .....	12
1.3.4. Воздействие факторов среды на рост и размно- жение микроорганизмов .....	13
1.3.5. Методы микробиологического анализа .....	13
1.3.6. Влияние микроорганизмов на качество и безо- пасность пищевых продуктов и материалов.....	14
1.3.7. Санитарно-микробиологический контроль про- изводства.....	15
1.3.8. Способы борьбы с нежелательной микрофлорой .....	16
1.3.9. Санитарно-гигиеническая экспертиза производ- ства пищевых продуктов.....	16
1.4. Перечень рекомендуемых лабораторных занятий .....	17
1.5. Перечень рекомендуемых тем курсовых работ .....	17
1.6. Рекомендуемая литература .....	18
<b>2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ И КОНТРОЛЬНЫЕ ЗАДАНИЯ .....</b>	<b>21</b>
2.1. Лекционные занятия .....	21
2.2. Лабораторные занятия.....	22
2.3. Курсовая работа .....	24
2.4. Контрольные задания .....	24
<b>3. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ .....</b>	<b>29</b>
3.1. Микробиологическая лаборатория и правила соблю- дения техники безопасности .....	29

---

3.1.1. Оснащение микробиологической лаборатории....	29
3.1.2. Правила работы и соблюдения техники безопасности в микробиологической лаборатории .....	30
3.2. Общая характеристика методов микробиологического анализа .....	32
3.3. Качественный микробиологический анализ и морфологические свойства микроорганизмов.....	35
Лабораторная работа № 1.	
Световая микроскопия, техника приготовления препаратов микроорганизмов и их морфологические свойства .....	35
3.4. Количественный микробиологический анализ.....	60
Лабораторная работа № 2.	
Микроскопические и культуральные методы микробиологического анализа. Определение общего количества микроорганизмов .....	60
3.5. Микробиологический контроль качества и безопасности пищевой продукции.....	79
3.5.1. Микробиологические показатели и нормативы контроля качества и безопасности пищевых продуктов.....	79
3.5.2. Стадии микробиологического анализа пищевых продуктов.....	82
Лабораторная работа № 3.	
Определение КМАФАнМ и санитарно-показательных микроорганизмов в пищевых продуктах.....	86
3.6. Современные методы микробиологического анализа .....	94
Лабораторная работа № 4.	
Билюминесцентный метод анализа микробиологической загрязненности поверхностей.....	95
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>101</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Нормативно-техническая документация.....</b>	<b>102</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Питательные среды и реагенты для культивирования и идентификации микроорганизмов.....</b>	<b>105</b>

---

---

## ПРЕДИСЛОВИЕ

---

---

Основу системы обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов составляют микробиологические методы контроля. Они включают как давно сложившиеся и широко используемые классические методы микробиологического анализа, так и современные методы микробиологических исследований.

Программа, методические указания, контрольные задания и лабораторные работы являются самостоятельной частью учебно-методического комплекса по дисциплине «Микробиологические методы контроля качества пищевых продуктов» и предназначены для студентов специальности 1–54 01 03 «Физико-химические методы и приборы контроля качества продукции» по специализации 1-54 01 03 02 «Сертификация пищевых товаров» заочной формы обучения, впервые знакомящихся с микробиологией.

Лабораторные работы направлены на освоение студентами практических навыков работы с микроорганизмами, использование микробиологических методов анализа для контроля качества и безопасности пищевой продукции.

В общемикробиологической части лабораторных занятий студенты знакомятся с морфологическими, культуральными, физиологическими признаками и свойствами микроорганизмов и методами их изучения. На занятиях формируются устойчивые навыки стерильной работы с микроорганизмами, осваиваются методы приготовления препаратов для световой микроскопии, техника посевов, культивирования и количественного подсчета микроорганизмов, а также процедура оценки качества микробиологических измерений.

Во второй части лабораторных занятий на основе приобретенных умений проводится микробиологический анализ пищевых продуктов на общее содержание микроорганизмов, присутствие технически вредных, санитарно-показательных и патогенных микроорганизмов. Одновременно у студентов формируются навыки работы с нормативно-технической документацией.

Для контроля качества пищевой продукции используются как классические, так и современные методы микробиологического анализа. Освоение данных методов микробиологического анализа позволяет студентам-заочникам использовать приобретенные умения и навыки для выполнения ими курсовых и дипломных работ.

---

---

# 1. ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ

---

---

Базовая учебная программа «Микробиологические методы контроля качества пищевых продуктов» разработана на основе образовательного стандарта для студентов технических вузов.

## 1.1. Назначение

Дисциплина «Микробиологические методы контроля качества пищевых продуктов» предназначена для студентов специальности 1-54 01 03 «Физико-химические методы и приборы контроля качества продукции» специализации 1-54 01 03 02 «Сертификация пищевых товаров» и читается для студентов очной и заочной форм обучения.

*Цель дисциплины* – подготовка квалифицированных специалистов в области микробиологического контроля качества и безопасности сельскохозяйственного сырья и пищевых продуктов, а также создание необходимого фундамента научно-практических знаний для работы с микроорганизмами и разработки новых экспресс-методов микробиологического анализа.

*Основные задачи:*

- дать студентам представление о предмете и задачах микробиологии, этапах ее развития и месте микробиологии в системе наук;
- охарактеризовать роль микроорганизмов в биосфере и в хозяйственной деятельности человека, контроле качества и безопасности сельскохозяйственного сырья и пищевых продуктов;
- сформировать представление об основных закономерностях организации микроорганизмов, их морфологических, культуральных, биохимических и физиологических свойствах;
- рассмотреть основные функции жизнедеятельности микроорганизмов, типы питания, дыхания, особенности их роста и способы размножения;
- охарактеризовать влияние внешних факторов среды на развитие микроорганизмов;
- дать представление об асептике и антисептике и используемых на производстве и в лабораторной практике способах борьбы с микроорганизмами;

– указать основные требования, предъявляемые к микробиологическому контролю сырья, полуфабрикатов, пищевых продуктов при их производстве и хранении;

– ознакомить с процедурой разработки микробиологических методов анализа;

– освоить основные методы качественного и количественного анализа содержания микроорганизмов, способы обнаружения и идентификации микроорганизмов в пищевых продуктах;

– ознакомить с основными правилами и порядком проведения санитарно-гигиенической экспертизы на пищевых предприятиях.

В результате изучения дисциплины **студент должен знать:**

– основы микробиологии и этапы ее развития;

– основные признаки и свойства микроорганизмов, их особенности и роль в окружающей среде и хозяйственной деятельности человека;

– разновидности микроорганизмов и уровни их организации;

– принципы и критерии систематики микроорганизмов;

– основные биологические понятия, законы и закономерности жизнедеятельности микроорганизмов;

– молекулярный, субклеточный, клеточный, популяционно-видовой уровни организации микроорганизмов;

– элементный и молекулярный химический состав клеток микроорганизмов, строение и функции биополимеров (белков, нуклеиновых кислот, жиров, углеводов) и отдельных биологически активных веществ;

– строение прокариотических и эукариотических клеток микроорганизмов (бактерий, дрожжей, грибов);

– основы жизнедеятельности микроорганизмов, типы их питания, дыхания, закономерности роста и способы размножения;

– основные группы микроорганизмов: полезные, технически вредные, патогенные, санитарно-показательные;

– пути загрязнения продуктов питания микроорганизмами;

– виды порчи пищевых продуктов и их основных возбудителей;

– этапы развития микроорганизмов в скоропортящихся продуктах (мясо, молоко, рыба);

– способы борьбы с технически вредной и патогенной микрофлорой;

– разновидности стерилизации, пастеризации, дезинфекции и оценки их эффективности;

- основные проблемы в области микробиологического контроля качества и безопасности пищевых продуктов и пути их решения;
- классические и современные методы анализа содержания микроорганизмов и оценки их жизнеспособности;
- методы идентификации микроорганизмов и анализа их видового состава;
- порядок разработки новых методов микробиологического анализа;
- организацию микробиологического контроля на предприятиях пищевой и перерабатывающей промышленности;
- порядок и правила проведения санитарно-гигиенической экспертизы и утилизации забракованной продукции.
- основные принципы формирования микробиологического качества и безопасности сырья, продовольственных продуктов в системах HACCP, ISO.

**Студент должен уметь:**

- приобретать новые знания, анализировать и систематизировать получаемую информацию;
- применять полученные знания для характеристики роста и размножения микроорганизмов, оценки их физиологической и биохимической активности;
- отбирать и подготавливать пробы пищевых продуктов для микробиологического анализа;
- готовить и стерилизовать питательные среды для культивирования микроорганизмов;
- выделять чистые культуры микроорганизмов из объектов окружающей среды и пищевых продуктов;
- использовать микроскопические методы анализа морфологических свойств микроорганизмов;
- внедрять современные системы контроля, управления и автоматизации технологических процессов;
- готовить препараты микроорганизмов и анализировать особенности их морфологического строения (присутствие спор, капсул, клеточных стенок, жгутиков);
- проводить микробиологический анализ пищевых продуктов и определять содержание общего количества и санитарно-показательных микроорганизмов;
- определять присутствие патогенных микроорганизмов (сальмонеллы, протеи, стафилококки, сульфатредуцирующие клостридии и др.) в пищевых продуктах;



- определять физиологическую активность и удельную скорость размножения микроорганизмов;
- проводить квалитетическую оценку качества микробиологических измерений;
- оценивать эффективность процессов стерилизации, пастеризации и дезинфекции;
- проводить санитарно-гигиеническую экспертизу пищевых продуктов и оформлять соответствующие акты.

Изучение дисциплины должно обеспечить формирование у студентов следующих компетенций:

**академические:**

- умение работать самостоятельно;
- владение исследовательскими навыками, включающими планирование и проведение эксперимента, обработку и интерпретацию результатов;
- умение осуществлять поиск, систематизацию и анализ информации по новейшим достижениям в микробиологии;
- умение применять полученные знания для решения теоретических и практических задач в производственной, исследовательской, учебной и управленческой деятельности в области оценки качества и безопасности пищевых продуктов;

**социально-личностные:**

- обладание способностью к межличностным коммуникациям;
- умение работать в коллективе.

**профессиональные:**

- владение методами и техникой исследований микроорганизмов и оценки качества микробиологических измерений;
- умение выделять из пищевых продуктов и количественно определять содержание санитарно-показательных микроорганизмов;
- умение проводить санитарно-микробиологическую экспертизу качества воды, воздуха и пищевых продуктов;
- умение применять приемы и методы борьбы с вредными микроорганизмами для обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов при их производстве, хранении и оценивать эффективность мероприятий;
- владение принципами формирования и управления микробиологическим качеством и безопасностью продовольственных продуктов в системах HACCP и ISO.

Основными методами (технологиями) обучения студентов являются: проблемное обучение, рейтинговая система оценки знаний, использование обучающе-исследовательского принципа в организации лабораторных и курсовых работ, преподавание с использованием компьютерных программ и электронных версий учебных пособий, демонстрация презентаций и видеороликов в процессе чтения лекций.

Учебный план дисциплины предусматривает для заочной формы обучения: всего 38 ч, из них 18 ч аудиторных занятий, в том числе 10 ч лекций, 8 ч лабораторных занятий; 20 ч – курсовая работа. Форма итогового контроля знаний студентов – экзамен.

При разработке учебных программ допускается изменение последовательности изучения, а также перенесение отдельных вопросов программы на лабораторные занятия или на самостоятельное изучение без нарушения целостности курса.

## 1.2. Примерный тематический план дисциплины

Название разделов	Количество аудиторных часов для студентов заочной формы обучения		
	всего	лекционных	лабораторных
Введение. Роль и значение микроорганизмов в природе и хозяйственной деятельности человека	1	1	
Морфология, систематика и классификация микроорганизмов	3	1	2
Физиология и биохимия микроорганизмов	1	1	
Воздействие факторов внешней среды на рост и размножение микроорганизмов	1	1	
Методы микробиологического анализа	3	1	2
Влияние микроорганизмов на качество и безопасность пищевых продуктов и материалов	2	2	
Санитарно-микробиологический контроль производства	3	1	2
Способы борьбы с нежелательной микрофлорой	3	1	2
Санитарно-гигиеническая экспертиза производства пищевых продуктов	1	1	
<i>Итого</i>	<i>18</i>	<i>10</i>	<i>8</i>

## 1.3. Содержание учебного материала

### 1.3.1. Введение. Роль и значение микроорганизмов в природе и хозяйственной деятельности человека

Предмет и задачи микробиологии. Место микробиологии в системе естественнонаучных дисциплин. Разделы науки. Исторические этапы развития микробиологии.

Роль микроорганизмов в природе и хозяйственной деятельности человека. Микрофлора почвы, воды, воздуха и человека.

### 1.3.2. Морфология, систематика и классификация микроорганизмов

*Основы систематики и классификации микроорганизмов.* Теория уровней организации живых организмов. Макро- и микроорганизмы. Неклеточные, клеточные и многоклеточные формы микроорганизмов. Современная классификация микроорганизмов. Принципы, задачи и разделы систематики микроорганизмов: таксономия, классификация, номенклатура. Фенотипические и филогенетические системы классификации микроорганизмов. Особенности систематики прокариот и эукариот. Систематика бактерий и мицелиальных грибов. Критерии систематики и их использование для идентификации микроорганизмов.

*Неклеточные формы жизни. Вирусы, прионы.* Особенности организации вирусов, их отличия от клеточных организмов. Строение вирионов: сложные и простые вирусы. Номенклатура и классификация вирусов. Особенности взаимодействия вирусов с другими организмами. Роль и значение вирусов в окружающей среде и жизнедеятельности человека. Прионы и характеристика их свойств.

*Субклеточный уровень организации микробных клеток.* Структура прокариотической и эукариотической клеток. Органеллы эукариотических животных и растительных клеток, их строение и функции. Ядро, цитоплазма, клеточный центр, цитоплазматическая мембрана, клеточная стенка, эндоплазматическая сеть, аппарат Гольджи, митохондрии, рибосомы, лизосомы, пероксисомы, хромосомы, вакуоли, пластиды, микротрубочки, микрофиламенты, ворсинки, жгутики, споры и другие клеточные структуры.

*Морфологические свойства микроорганизмов.* Строение, морфологические свойства бактерий, дрожжей, мицелиальных грибов. Размеры, форма, взаиморасположение клеток.

### 1.3.3. Физиология и биохимия микроорганизмов

*Неорганические вещества клеток.* Элементный и молекулярный химический состав клеток. Вода, ее свойства и роль в живых организмах. Значение макро-, микроэлементов и солей в клетках.

*Органические вещества клеток.* Белки, ферменты. Строение, свойства и функции белков в живых организмах. Нуклеиновые кислоты. Строение, свойства и функции нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты как основной источник хранения и передачи наследственной информации в клетках. Уровни структурной организации нуклеопротеида в клетках. Понятие о генах, генотипе, фенотипе. Генетический код и кодирование информации. Углеводы, липиды и биологически важные молекулы, их строение и роль в клетках. АТФ как универсальный источник энергии в клетках.

*Жизнедеятельность микроорганизмов.* Клеточный метаболизм: катаболизм и анаболизм. Обмен веществ, энергии и информации в клетках. Принцип биохимического и функционального единства живых организмов.

*Питание микроорганизмов.* Питательные вещества как источники биогенных элементов для микроорганизмов. Типы и механизмы транспорта веществ в клетки и из клеток. Классификация типов и способов питания микроорганизмов. Характеристика основных групп питания микроорганизмов: фотолитоавтотрофы, фотоорганавтотрофы, хемолитоавтотрофы, хемоорганогетеротрофы. Фотосинтез у микроорганизмов. Питательные среды, их классификация и принципы составления.

*Дыхание микроорганизмов.* Дыхание и преобразование энергии в клетках. Аэробное и анаэробное клеточное дыхание. Общая характеристика стадий клеточного дыхания. Гликолиз. Брожение. Цикл трикарбоновых кислот. Дыхательная цепь переноса электронов. Синтез АТФ в клетках.

*Закономерности роста и размножения микроорганизмов.* Характеристика понятий роста и размножения клеток. Рост микробной популяции в статической (периодической) культуре: кривая роста, характеристика фаз роста, особенности экспоненциального роста. Параметры роста клеточной популяции: концентрация клеток, плотность суспензий, удельная скорость размножения клеток, время генерации, время удвоения, урожай, экономический коэффициент. Способы определения параметров

роста микробных популяций. Разновидности способов бесполого и полового размножения микроорганизмов.

#### **1.3.4. Воздействие факторов среды на рост и размножение микроорганизмов**

*Биоцидные и биостатические факторы среды.* Активирующее, ингибирующее и токсичное действие факторов внешней среды на микроорганизмы.

*Влияние физических и физико-химических факторов на развитие микробных популяций.* Воздействие температуры, аэрации, влажности, электромагнитных излучений, осмотического и гидростатического давления, рН, еН среды и др. на микроорганизмы.

*Влияние химических и биологических факторов на развитие микроорганизмов.* Дезинфектанты, антисептики, консерванты, химиотерапевтические агенты и антибиотики. Виды взаимоотношений между микроорганизмами. Симбиоз, антагонизм, аменсализм, коменсализм, нейтрализм, паразитизм, хищничество.

*Механизмы защиты микроорганизмов в неблагоприятных условиях.* Индивидуальная и коллективная защита микроорганизмов. Адаптация микроорганизмов. Образование клеточных ассоциатов, биопленок, dormantных форм микроорганизмов.

#### **1.3.5. Методы микробиологического анализа**

*Качественный и количественный учет микроорганизмов.* Прямые и косвенные методы определения микроорганизмов. Классификация методов микробиологического анализа. Анализ общего содержания микроорганизмов. Определение видового состава микроорганизмов.

*Методы световой микроскопии.* Устройство, назначение светового микроскопа и правила работы с ним. Показатели световой микроскопии: увеличение, разрешающая способность, апертура, глубина резкости. Метод микроскопии в светлом поле. Приготовление препаратов для световой микроскопии: метод раздавленной капли, метод висячей капли, метод мазков. Простые и сложные методы окрашивания микроорганизмов. Анализ морфологических свойств и органелл бактерий, дрожжей, мицелиальных грибов, микроводорослей. Окраска вегетативных тел, клеточных стенок, спор, капсул.

*Методы посева и культивирования микроорганизмов.* Назначение, возможности и ограничения методов посева и культивирования

микроорганизмов. Многообразие способов посева и культивирования микроорганизмов в питательные среды: глубинный посев, поверхностный посев шпателем, посев уколом, посев на скошенный агар. Методы периодического и непрерывного культивирования. Приготовление жидких и твердых питательных сред для посева и культивирования микроорганизмов. Стерилизация питательных сред автоклавированием. Автоклав и его устройство. Особенности культивирования микроорганизмов в аэробных и анаэробных условиях. Характеристика способов хранения микроорганизмов.

*Стандартные методы определения общего содержания и видового состава микроорганизмов.* Правила и порядок проведения микробиологического анализа. Отбор проб пищевых продуктов для микробиологических испытаний. Приготовление разведений проб. Посев микроорганизмов в жидкие и агаризованные среды. Порядок и условия культивирования клеток бактерий, грибов, дрожжей. Расчет численности микроорганизмов в анализируемых средах и оценка качества измерений.

Метод определения количества мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов. Методы определения видового состава микроорганизмов. Получение чистой культуры микроорганизмов и проверка ее чистоты. Анализ морфологических, культуральных, физиологических и биохимических свойств микроорганизмов. Методы идентификации: бактерий группы кишечных палочек, *E. coli*, клебсиел, золотистого стафилококка, сальмонелл, сульфат редуцирующих клостридий, протеев, псевдомонад, дрожжей, мицелиальных грибов.

*Современные инструментальные методы микробиологического анализа.* Методы определения жизнеспособности, физиологической и биохимической активности микроорганизмов. Электрические, оптические, теплотрические методы определения содержания и видового состава микроорганизмов. Методы биокалориметрии, биолюминесценции.

### **1.3.6. Влияние микроорганизмов на качество и безопасность пищевых продуктов и материалов**

*Микробиологическое качество и безопасность пищевой продукции.* Квалиметрическая оценка качества продукции. Нормативные требования и показатели микробиологического контроля качества и безопасности пищевой продукции. Характеристика основных

групп микроорганизмов: полезных, патогенных, потенциально-патогенных, санитарно-показательных, технически вредных.

*Патогенные и потенциально-патогенные микроорганизмы.* Признаки патогенности микроорганизмов. Влияние микроорганизмов на безопасность пищевых продуктов. Пищевые отравления. Эндо- и экзотоксины. Пищевые инфекции.

*Технически вредная микрофлора.* Биоповреждения продукции микроорганизмами: биообрастание, биодеструкция, биокоррозия. Разновидности биологической порчи пищевых продуктов: гниение, плесневение, брожение и др. Основные виды микроорганизмов, вызывающих порчу пищевых продуктов и материалов.

*Санитарно-показательные микроорганизмы и их характеристика.* Основные признаки санитарно-показательных микроорганизмов. Бактерии группы кишечных палочек, *E. coli*. Определение БГКП, коли-титра и коли-индекса.

*Полезная микрофлора:* пробиотики, антагонисты, закваски.

### **1.3.7. Санитарно-микробиологический контроль производства**

Классификация пищевых отраслей аграрно-промышленного комплекса. Санитарно-микробиологический контроль на предприятиях пищевой промышленности. Входной, технологический и выходной контроль производства. Микробиологический контроль сырья, полуфабрикатов и готовой продукции. Система микробиологического контроля качества и безопасности продукции. Требования нормативно-технической документации к микробиологическим показателям качества пищевых продуктов. Принципы формирования и управления микробиологическим качеством и безопасностью продукции в системах HACCP и ISO.

*Санитарно-микробиологический контроль молока и молочных продуктов.* Этапы и особенности развития микроорганизмов в молоке и молочных продуктах. Виды микробиологической порчи молока и молочной продукции. Стадии производства молока и молочных продуктов и их микробиологические риски. Микробиологические показатели качества молока и молочной продукции. Методы микробиологического анализа молока и молочных продуктов.

*Санитарно-микробиологический контроль мяса и мясопродуктов.* Этапы и особенности развития микроорганизмов в мясе и мя-

сопродуктах. Виды микробиологической порчи мяса и мясопродуктов. Стадии производства мяса и мясопродуктов и их микробиологические риски. Микробиологические показатели качества мяса и мясопродуктов. Методы микробиологического анализа мяса и мясопродукции.

*Санитарно-микробиологический контроль рыбы и рыбопродуктов.* Этапы и особенности развития микроорганизмов в рыбе и рыбопродуктах. Виды микробиологической порчи рыбы и рыбной продукции. Стадии производства рыбы и рыбопродуктов и их микробиологические риски. Микробиологические показатели качества рыбы и рыбопродуктов. Методы микробиологического анализа рыбы и рыбной продукции.

### **1.3.8. Способы борьбы с нежелательной микрофлорой**

*Асептика и антисептика.* Правила асептики. Антисептика и разновидности способов подавления и удаления нежелательных микроорганизмов. Использование физических и химических факторов для регуляции жизнеспособности микроорганизмов при производстве и хранении пищевых продуктов.

*Тепловые способы подавления микроорганизмов.* Стерилизация и пастеризация, их разновидности и режимы обработки. Механизмы гибели споровых и вегетативных форм клеток. Определение эффективности стерилизации и пастеризации.

*Дезинфекция и дезинфицирующие вещества.* Основные требования, предъявляемые к дезинфицирующим веществам. Механизмы действия дезинфицирующих веществ. Оценка эффективности применения биоцидных средств.

### **1.3.9. Санитарно-гигиеническая экспертиза производства пищевых продуктов**

*Санитария и гигиена.* Производственная санитария и гигиена. Профилактические мероприятия и личная гигиена работников. Цели и задачи санитарно-гигиенической экспертизы. Документы, регламентирующие проведение санитарно-гигиенической экспертизы. Порядок и правила проведения санитарно-гигиенической экспертизы.

*ПДК и классификация годности пищевой продукции.* Предельно допустимые концентрации чужеродных веществ в пищевых продуктах. Пищевые продукты: годные, условно годные, непригод-



ные к использованию в пищу животным и на технические цели, эпидемиологически опасные пищевые продукты. Порядок и правила уничтожения забракованной продукции.

### **1.4. Перечень рекомендуемых лабораторных занятий**

1. Световая микроскопия и техника приготовления препаратов микроорганизмов. Морфология бактерий, мицелиальных грибов и дрожжей.

2. Приготовление питательных сред и техника посева и культивирования микроорганизмов. Определение общего содержания, жизнеспособности и активности микроорганизмов.

3. Микробиологический анализ качества и безопасности пищевых продуктов. Определение КМАФАнМ, санитарно-показательных микроорганизмов и оценка соответствия продукции требованиям нормативно-технической документации.

4. Современные микробиологические методы экспресс-контроля качества и безопасности пищевой продукции, анализа эффективности процессов стерилизации, пастеризации и дезинфекции.

### **1.5. Перечень рекомендуемых тем курсовых работ**

1. Анализ развития микроорганизмов на поверхности материалов и пищевых продуктов.

2. Разработка экспресс-метода определения общего количества микроорганизмов в пищевой продукции.

3. Способы защиты пищевых продуктов от микробиологической порчи и прогнозирование сроков их хранения.

4. Анализ видового состава микроорганизмов в пищевых продуктах.

5. Методы оценки биостойкости и степени защиты продукции от биоповреждений микроорганизмами.

6. Методы анализа санитарно-показательных микроорганизмов в водной среде и пищевых продуктах.

7. Методы оценки активности, безопасности и эффективности дезинфицирующих веществ.

8. Методы анализа жизнеспособности, физиологической и биохимической активности микроорганизмов и оценки сроков хранения пищевых продуктов.

9. Анализ эффективности использования антимикробных веществ и адаптации микроорганизмов.

10. Методы оценки безопасности антимикробных средств.

11. Современные антимикробные вещества и их использование для подавления жизнедеятельности микроорганизмов.

12. Методы и средства борьбы с биоповреждениями материалов микроорганизмами.

13. Биопленки микроорганизмов, изучение механизмов их образования и способов разрушения.

14. Культивируемые и некультивируемые формы микроорганизмов.

15. Современные методы микробиологического контроля качества и безопасности пищевых продуктов.

## Рекомендуемая литература

### Основная

1. Белясова, Н. А. Микробиология: учеб. пособие для студентов специальностей «Биотехнология» и «Биоэкология» / Н. А. Белясова. – Минск: БГТУ, 2005. – 292 с.

2. Белясова, Н. А. Микробиология. Лабораторный практикум: учеб. пособие для студентов специальностей «Биотехнология», «Биоэкология», «Биология» / Н. А. Белясова. – Минск: БГТУ, 2007. – 160 с.

3. Шлегель, Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. – М.: Мир, 1987. – 567 с.

4. Методы общей бактериологии: в 3 т. / под ред. Ф. Герхардта [и др.]. – М.: Мир, 1983–1984. – Т. 1 – 536 с.; Т. 2. – 472 с.; Т. 3. – 264 с.

5. Стейниер, Р. Мир микробов: в 3 т. / Р. Стейниер, Э. Эдельберг, Дж. Ингрэм. – М.: Мир, 1979. – Т. 1 – 320 с.; Т. 2. – 334 с.; Т. 3. – 486 с.

6. Гусев, М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. – М.: Академия, 2007. – 462 с.

7. Экология микроорганизмов / под ред. А. И. Нетрусова. – М.: Академия, 2004. – 272 с.

8. Кузнецов, А. Е. Научные основы экобиотехнологии / А. Е. Кузнецов, Н. Б. Градова. – М.: Мир, 2006. – 504 с.

9. Микробиология продуктов животного происхождения / под ред. Н. С. Королевой и соавт. – М.: – Агропромиздат, 1985. – 360 с.

10. Жвирблянская, А. Ю. Микробиология в пищевой промышленности / А. Ю. Жвирблянская, О. А. Бакушинская. – М.: Пищевая пром-сть, 1975. – 320 с.

#### Дополнительная

1. Елинов, Н. П. Химическая микробиология / Н. П. Елинов. – М.: Высш. шк., 1989. – 448 с.

2. Воробьева, Л. И. Промышленная микробиология / Л. И. Воробьева. – М.: МГУ, 1989. – 294 с.

3. Бери, Д. Биология дрожжей / Д. Бери. – М.: Мир, 1985. – 96 с.

4. Квасников, Е. И. Дрожжи. Биология. Пути использования / Е. И. Квасников, И. Ф. Щелокова. – Киев: Навук. думка, 1991. – 328 с.

5. Лабинская, А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А. С. Лабинская. – М.: Медицина, 1978. – 392 с.

6. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / под ред. Н. С. Егорова. – М.: МГУ, 1995. – 222 с.

7. Звягинцев, Д. Г. Почва и микроорганизмы / Д. Г. Звягинцев. – М.: МГУ, 1987. – 256 с.

8. Кожевин, П. А. Микробные популяции в природе / П. А. Кожевин. – М.: МГУ, 1989. – 175 с.

9. Методы почвенной микробиологии и биохимии / под ред. Д. Г. Звягинцева. – М.: МГУ, 1991. – 303 с.

10. Ганина, В. И. Техническая микробиология продуктов животного происхождения: учеб. пособие / В. И. Ганина, Н. С. Королева, С. А. Фильчакова – М.: ДеЛипринт, 2008. – 352 с.

11. Продовольственное сырье и пищевые продукты: Гигиенические требования безопасности пищевой ценности пищевых продуктов: СанПиН 2.3.2.1078–01. – Введ. 01.09.2002. – М.: Минздрав РФ, 2002. – 168 с.

12. Жарикова, Г. Г. Микробиология продовольственных товаров. Санитария и гигиена: учебник / Г. Г. Жарикова. – 3-е изд. – М.: Издат. центр «Академия», 2008. – 300 с.

13. Меркулова, Н. Г. Производственный контроль в молочной промышленности / Н. Г. Меркулова. – М.: Колос, 2007. – 310 с.

14. Блэкберн, К. В. Микробиологическая порча пищевых продуктов / Клив де В. Блэкберн. – СПб.: Профессия, 2008. – 781 с.

15. Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов: СанПиН 11–63 РБ 98: утв. постановлением Гл. гос. сан. врача Респ. Беларусь от 28.04.1998, № 18. – Минск, 1998.

16. Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов: СНИП и ГН. – Минск: Госстандарт, 2009. – 168 с.

17. Санитарно-эпидемиологические требования к осуществлению производственного контроля при производстве, реализации, хранении, транспортировке продовольственного сырья и (или) пищевых продуктов: СНИП 8/25402: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь от 30.03.2012 № 32. – Минск, 2012.

---

---

## 2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ И КОНТРОЛЬНЫЕ ЗАДАНИЯ

---

---

Преподавание дисциплины предусматривает проведение лекций, лабораторных занятий, выполнение курсовой работы, а также самостоятельную работу студентов.

### 2.1. Лекционные занятия

Лекционные занятия предназначены для получения системных знаний о микроорганизмах, их роли в природе, влиянии на качество и безопасность пищевых продуктов, особенностях их строения, функциях жизнедеятельности, способах борьбы с нежелательной микрофлорой, порядком и правилами проведения санитарно-гигиенической экспертизы пищевых продуктов, методах микробиологического контроля, порядке их разработки и внедрения в производство.

Курс лекций по дисциплине студентами-заочниками изучается в два этапа. На первом этапе на установочной лекции студент получает конкретные указания по структуре курса и методике его изучения, вопросам, которые необходимо проработать самостоятельно в соответствии с рекомендуемым списком литературы, а также тему курсовой работы.

Каждый студент-заочник получает дополнительно по три вопроса для выполнения контрольной работы № 1, целью которой является контроль глубины самостоятельного усвоения знаний по основным направлениям изучаемого курса.

После ответа на предлагаемые вопросы работа высылается в университет для ее рецензии. В случае получения неудовлетворительной оценки работа студента направляется на повторную доработку. По результатам контрольной работы № 1 студент допускается к учебной сессии.

На втором этапе работы проводятся аудиторские занятия. На лекциях рассматриваются запланированные темы по программе курса и наиболее сложные для восприятия студентов вопросы, требующие систематических знаний. Дается обобщенный взгляд по изучаемой проблеме на основе системного подхода, а также рассматрива-

ются теоретические основы методов микробиологического анализа и их практическое применение для контроля качества и безопасности пищевой продукции. Ввиду ограниченности числа аудиторных занятий для студентов заочной формы обучения основная часть их учебного времени отводится на самостоятельную работу.

## 2.2. Лабораторные занятия

Лабораторные занятия являются обязательной частью курса «Микробиологические методы контроля качества пищевых продуктов». Студент, пропустивший лабораторные занятия и не отработавший их в установленное время, не допускается к экзамену.

Лабораторные занятия обеспечивают закрепление теоретических знаний, полученных на лекционных занятиях, а также способствуют приобретению умений и навыков работы с микроорганизмами для контроля микробиологических показателей качества и безопасности пищевых продуктов.

Лабораторные работы оформляются в соответствии с общими требованиями с указанием: темы, цели, материалов и оборудования, общих теоретических сведений по изучаемому вопросу, задания; описанием хода работы, полученных результатов в виде таблиц, графиков, фотографий и их анализа; изложением выводов по работе и ответа на контрольные вопросы для закрепления материала.

Особенностью лабораторных работ, выполняемых по морфологии микроорганизмов, является необходимость зарисовки строения, формы, взаиморасположения микроорганизмов. Для облегчения данной работы предпочтительнее использовать фотографии, получаемые при микроскопировании препаратов микроорганизмов с помощью встроенной цифровой фотокамеры мобильного телефона.

При проведении лабораторных занятий по культивированию микроорганизмов, где необходимо использование классических методов микробиологического анализа, длительность процедуры получения конечного результата составляет 5 сут. Для видового анализа микроорганизмов необходимо периодически пересеивать культуры на новые среды и проводить их морфологическую идентификацию. В этом случае основное время лабораторных занятий разбивается на части с учетом специфики данной работы. Кроме того, в начале каждой лабораторной работы подводится итог полученных результатов, их коллективное обсуждение и оформление.

При проведении посевов микроорганизмов требуется большой расход питательных сред и используемой стерильной посуды, которых может не хватать в условиях большого количества студентов разных специальностей, занимающихся в микробиологической лаборатории. Это вызывает необходимость планирования проведения работ таким образом, чтобы каждый студент приобретал навыки самостоятельного приготовления стерильных питательных сред и посуды, экономного их использования, своевременной очистки и возврата используемой посуды, утилизации отработанных сред после получения результатов.

Для активации работы студентов, а также сокращения объема используемой посуды и питательных сред на этапе получения начальных навыков и при анализе микробиологического качества пищевых продуктов целесообразно проведение занятий студентов в подгруппах по 2–3 человека. Задания для каждой подгруппы студентов несколько отличаются, чтобы исключить списывание результатов в группе.

Функции студентов внутри подгруппы периодически меняются таким образом, чтобы каждый студент поработал на каждой операции микробиологического анализа (отбор и подготовка проб, приготовление разведений, проведение посевов и культивирования микроорганизмов, подсчет результатов измерений и оценка их качества).

Часть времени лабораторных занятий используется для контроля самостоятельной работы студентов. Она может осуществляться в ходе текущего и итогового контроля знаний в форме устного опроса, коллоквиумов, письменных контрольных работ, выступления с рефератами, подготовки презентаций на выбранную тему, интересующую студентов в рамках курса.

Одной из хорошо зарекомендовавших форм контроля самостоятельной работы студентов являются письменные контрольные работы. Студенты заочной формы обучения выполняют 2 контрольные работы: № 1 – по основным разделам курса для контроля их готовности к учебному семестру и № 2 – итоговую работу по практическим занятиям, по результатам которой они получают зачет по лабораторному практикуму и допускаются к экзаменационной сессии.

Контрольная работа № 2 содержит теоретический вопрос по курсу лекций, практический вопрос из лабораторного практикума,

а также задачу. Решение задач позволяет студентам глубже понять изучаемые вопросы и попрактиковаться в использовании своих знаний для практических приложений.

### 2.3. Курсовая работа

Курсовая работа предназначена для совершенствования навыков самостоятельной и исследовательской работы студентов, расширения их кругозора и более глубокого знакомства с одной из актуальных тем микробиологии и микробиологического контроля качества пищевой продукции по выбору. Она также способствует развитию полученных знаний и совершенствованию приобретенных навыков для исследования и разработки новых экспресс-методов микробиологического анализа.

Задание на курсовую работу выдается для студентов-заочников на установочной лекции в начале курса, а для студентов-очников через 1–2 месяца после начала изучения дисциплины и после приобретения первых навыков работы с микроорганизмами. Это способствует более осознанному выбору темы курсовой работы.

Курсовая работа состоит из двух основных частей: теоретической и практической. В теоретической части работы необходимо показать умение работать с литературой, систематизировать найденную информацию, понимать теоретические основы методов анализа, определять нерешенные проблемы. В экспериментальной части работы требуется показать умение использовать известные методы микробиологического анализа для оценки качества и безопасности пищевых продуктов, а также применить полученные навыки работы с микроорганизмами для исследования их свойств физико-химическими, биофизическими методами и для разработки новых методов микробиологического анализа.

Защита и оценка курсовых работ проводится в процессе индивидуальной беседы преподавателя со студентами.

### 2.4. Контрольные задания

Контрольные задания предназначены для выполнения студентами контрольной работы № 1. Отвечая на вопросы контрольного задания, студент не должен механически переписывать соответст-



вующие разделы учебника или другого источника. Ответы должны быть краткими, но полными, выраженными своими словами на основе осмысления прочитанной литературы и собственного опыта. Желательно иллюстрировать ответ рисунками, схемами и примерами.

Контрольные задания формируются на основе вопросов, вносимых в экзаменационные билеты. В каждом контрольном задании содержатся по 3 вопроса, охватывающих разные разделы программы курса. Отбор конкретных вопросов в контрольные задания проводится преподавателем на основе таблицы случайных чисел.

Ниже приведен перечень вопросов, используемых для составления контрольных заданий.

### **Вопросы для контрольных заданий**

1. Объект, предмет и значение микробиологического контроля качества пищевой продукции.
2. Задачи и цели микробиологического анализа качества пищевой продукции в современных условиях. Требования, предъявляемые промышленностью к микробиологическому анализу.
3. Микробиологические показатели качества продукции.
4. Санитарно-микробиологический контроль рыбы и рыбопродуктов.
5. Санитарно-микробиологический контроль мяса и мясопродуктов. Микробиологические пороки мясных продуктов и возбудители их вызывающие.
6. Санитарно-микробиологический контроль молока и молочных продуктов.
7. Особенности санитарно-микробиологического контроля зерна, крупы, муки и хлеба.
8. Санитарно-микробиологический контроль плодов и овощей.
9. Санитарно-микробиологический контроль кондитерских и вкусовых продуктов.
10. Санитарно-микробиологический контроль безалкогольных напитков.
11. Виды размножения микроорганизмов и их характеристика. Особенности размножения бактерий, дрожжей и мицелиальных грибов.
12. Классификация микроорганизмов. Основные подходы и критерии современной систематики микроорганизмов.

13. Морфологические, культуральные и физиологические признаки микроорганизмов.

14. Строение и функции вирусов. Размножение вирусов.

15. Методы качественного анализа микробиологической загрязненности пищевых продуктов.

16. Методы количественного анализа содержания микроорганизмов в пищевых продуктах.

17. Схема определения КМАФАнМ методом посева и культивирования.

18. Характеристика бактерий группы кишечной палочки. Общая схема определения бактерий группы кишечной палочки.

19. Методы определения дрожжей и плесеней в пищевых продуктах.

20. Потенциально-патогенные и патогенные микроорганизмы, их характеристика и методы определения.

21. Отбор проб и порядок проведения микробиологических испытаний. Стадии микробиологических исследований пищевых продуктов.

22. Чистые культуры микроорганизмов и способы их выделения. Общая схема определения вида микроорганизмов.

23. Методы определения клебсиел, золотистого стафилококка и сальмонелл.

24. Методы определения клостридий, протей в мясных продуктах.

25. Характеристика методов посева и культивирования микроорганизмов. Периодическое и непрерывное культивирование микроорганизмов.

26. Микробиологические лаборатории и их оборудование. Правила безопасности при работе в микробиологической лаборатории.

27. Микробиологические питательные среды, их классификация, назначение и методы контроля.

28. Принципы культивирования микроорганизмов. Виды питательных сред и принципы их составления.

29. Чистые культуры клеток, их получение и изучение свойств микроорганизмов.

30. Общее представление о метаболизме микробных клеток. Катаболизм и анаболизм.

31. Клеточное дыхание. Дыхательные субстраты. Аэробное и анаэробное дыхание.

32. Стадии дыхания. Гликолиз. Брожение и его виды.

33. Цикл трикарбоновых кислот и дыхательная цепь переноса электронов.
34. Типы питания микроорганизмов и питательные субстраты.
35. Ферменты и их роль в метаболизме микроорганизмов.
36. Санитарно-показательные микроорганизмы и методы их определения.
37. Методика взятия и исследования смывов на предприятиях пищевой промышленности.
38. Микробиологический анализ качества воды.
39. Микробиологический анализ качества воздуха.
40. Современные инструментальные методы анализа содержания и биомассы микроорганизмов.
41. Микроорганизмы почвы и их характеристика.
42. Влияние физико-химических факторов среды на жизнеспособность микроорганизмов.
43. Стерилизация и пастеризация. Методы стерилизации и пастеризации пищевых продуктов.
44. Рост микроорганизмов. Параметры роста клеточной популяции.
45. Производственная санитария. Мойка и дезинфекция. Моюще-дезинфицирующие вещества.
46. Характеристика морфологических и культуральных признаков бактерий, мицелиальных грибов и дрожжей.
47. Основные органеллы бактериальных клеток.
48. Химический состав микроорганизмов. Биогенные химические элементы и их роль в клетке.
49. Фотосинтез. Характеристика фотосинтеза у бактерий.
50. Пищевые токсикозы, пищевые токсикоинфекции и их основные возбудители.
51. Профилактические мероприятия и личная гигиена для предотвращения пищевых отравлений.
52. Микробиологический контроль сырья, полуфабрикатов и готовой продукции.
53. Методы определения общего микробного числа.
54. Методы определения колититра.
55. Цели, задачи и порядок проведения санитарно-гигиенической экспертизы пищевых продуктов.
56. Классификация годности пищевых продуктов. Порядок уничтожения забракованной продукции.

57. Основные органические компоненты бактериальных клеток: белки, углеводы, жиры. Характеристика их строения и функции в клетке.

58. Нуклеиновые кислоты и их роль в клетке.

59. Аденозинтрифосфорная кислота как универсальный химический источник энергии в клетке. Способы получения АТФ в клетках.

60. Действие химических факторов на рост и развитие микроорганизмов. Ингибиторы и активаторы микроорганизмов.

61. Общая характеристика методов качественного и количественного учета микроорганизмов.

62. Бактериоскопические методы анализа продукции. Техника приготовления мазка и окрашивания по Граму.

63. Методы индикации и идентификации энтеробактерий и оценки их жизнеспособности.

64. Правила и приемы микроскопии микроорганизмов. Техника приготовления препаратов бактерий, дрожжей, мицелиальных грибов для световой микроскопии.

65. Методы окраски спор, капсул, клеточных стенок и определения жизнеспособности микроорганизмов.

66. Техника посева образцов в жидкие среды. Метод последовательных разведений для определения общего количества микроорганизмов.

67. Глубинный и поверхностный способы посева микроорганизмов на агаризованные среды и определения общего количества микробных клеток.

68. Методы определения спорообразующих бактерий и их идентификация.

69. Подготовка проб мясных и рыбных продуктов для проведения микробиологических исследований.

70. Выявление бактерий группы протей в мясных продуктах.

---

---

## **3. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ**

---

---

### **3.1. Микробиологическая лаборатория и правила соблюдения техники безопасности**

#### **3.1.1. Оснащение микробиологической лаборатории**

В структуру микробиологической лаборатории входят следующие помещения.

1. Комната и бокс для работы в условиях асептики.

2. Автоклавная для стерилизации посуды, питательных сред и отработанного инфицированного материала.

Все помещения должны быть оборудованы водопроводом, канализацией, вентиляцией, розетками для подключения электрооборудования. Стены, полы должны быть покрыты масляной краской или кафельной плиткой. Лабораторные столы должны быть покрыты пластиком.

Лабораторная комната и бокс должны быть оборудованы ультрафиолетовым источником света для периодической обработки помещений и снижения концентрации микроорганизмов в воздухе.

В работе микробиолога необходимы:

– дистиллятор для получения обессоленной воды, приготовления физиологического раствора и питательных сред;

– моечное место для мойки, высушивания посуды;

– шкафы для хранения реактивов и нестерильной посуды;

– весовая для взвешивания реагентов и приготовления питательных сред;

– автоклавная для тепловой стерилизации посуды и питательных сред;

– СВЧ-оборудование для плавления и термостатирования агаризованных питательных сред;

– место для приготовления разведений и посевов микроорганизмов в стерильных условиях;

– термостаты для культивирования микроорганизмов на 30°C, 37°C, 44°C;

– шкафы для хранения стерильной посуды и готовых питательных сред;

– холодильники для хранения культур клеток и посевов.

В качестве инструментов, средств измерений и принадлежностей для проведения микробиологического анализа применяются:

- световой микроскоп и принадлежности к нему;
- набор средств для приготовления и окраски препаратов для световой микроскопии;
- измерительное оборудование: рН-метр с электродами; биокалориметр, люминометр с устройствами для измерения биолюминесценции;
- микробиологические инструменты: петли и иглы для отбора культур клеток; пинцеты; шпатели для посева микроорганизмов, счетные камеры для подсчета микроорганизмов; автоматический счетчик колоний клеток; автоматические пипетки объемом от 10 мкл до 5 см<sup>3</sup> со сменными наконечниками;
- вспомогательные материалы: наборы реактивов, углеводов, питательных сред, красителей для микробиологии; стерильный кварцевый песок для гомогенизации проб пищевых продуктов; бумажные фильтры и др.;
- микробиологическая посуда (предметные и покровные стекла, чашки Петри, стеклянные пипетки объемом 0,1 см<sup>3</sup>, 1 см<sup>3</sup>, 2 см<sup>3</sup>, 5 см<sup>3</sup>, 10 см<sup>3</sup>; микробиологические пробирки, плоскодонные колбы, сосуды, цилиндры, объемом 10 см<sup>3</sup>, 25 см<sup>3</sup>, 50 см<sup>3</sup>, 100 см<sup>3</sup>, 300 см<sup>3</sup>, 500 см<sup>3</sup>, 1000 см<sup>3</sup>).

Особенностью микробиологической посуды в отличие от посуды химической лаборатории является то, что горловина микробиологических пробирок и колб имеет гладкую поверхность, что позволяет легко закрывать их алюминиевыми колпачками и снимать их в процессе работы, поддерживая стерильность посуды и ее содержимого.

Другой особенностью посуды является то, что у стеклянных микробиологических пипеток обламывают носики для быстрого набора и слива питательных сред. Это вызывает вначале трудности у студентов в наборе и дозировании нужного объема растворов и сред в условиях отсутствия у них необходимых навыков.

### **3.1.2. Правила работы и соблюдения техники безопасности в микробиологической лаборатории**

При работе в микробиологической лаборатории должны соблюдаться следующие правила.

1. Студент должен пройти инструктаж по технике безопасности в микробиологической лаборатории и расписаться в журнале.

2. Каждый студент должен переодеваться вне микробиологического помещения и находиться в лаборатории в белом, чистом халате. Он должен работать на своем постоянном рабочем месте, на котором не должно находиться посторонних предметов.

3. В лаборатории запрещается курение, прием пищи. После работы с микроорганизмами необходимо вымыть руки с мылом.

4. При работе со спиртовками необходимо соблюдать правила техники безопасности. Поджигать спиртовку нужно на вытянутой руке, убедившись в наличии достаточного количества спирта в ней и контакта с фитилем. Запрещается вытягивать фитиль при горячей спиртовке во избежание ее возгорания и взрыва. В случае возгорания спирта необходимо накрыть место рукавицей для взятия горячей посуды или халатом для предотвращения доступа воздуха. В особо опасных случаях нужно использовать песок и огнетушитель.

5. На посуде, используемой для приготовления разведений, посева и культивирования микроорганизмов, должны быть сделаны подписи фломастером, содержащие сведения о родовом и видовом названии микроорганизмов, дате засева, разведении, Ф. И. О. студента и номере группы.

6. Основой для микробиолога является выработка навыков стерильной работы. Все операции должны проводиться со стерильной посудой и в стерильных условиях. Снятие колпачков и закрытие стерильной посуды, а также отбор и перенос проб должны осуществляться через операцию тепловой обработки в пламени спиртовки.

7. Вся посуда, используемая для работы микробиолога, должна быть подвергнута тепловой стерилизации и храниться в закрытом состоянии: пробирки и колбы – закрыты колпачками из алюминиевой фольги, пипетки – находиться в бумажных пакетах и доставаться из них по мере необходимости. Запрещается касаться руками стерильных пипеток в области, опускаемой в питательную среду.

8. Отработанный инфицированный материал необходимо собирать в отдельный полиэтиленовый пакет и обрабатывать в зависимости от степени опасности микроорганизмов автоклавированием или прогревом в СВЧ-печи перед выбросом в канализацию или мусоропровод. Использованные инструменты после работы обеззараживают в пламени горелки или 75%-ным спиртом.

9. Необходимо соблюдать правила электробезопасности при работе с электрическим оборудованием.

10. В конце занятия каждый студент должен привести свое рабочее место в порядок и обработать поверхность стола спиртом.

### 3.2. Общая характеристика методов микробиологического анализа

Микробиологический контроль производства – основа выпуска высококачественной продукции, обеспечения ее сохранности и безопасности для здоровья потребителей.

Основная задача микробиологического контроля – как можно быстрее, точнее, дешевле получить информацию об общей микробиологической загрязненности сырья, вспомогательных материалов, оборудования и выпускаемой продукции, а также наличии среди микроорганизмов технически вредной, санитарно-показательной и патогенной микрофлоры.

Существует два основных вида микробиологического анализа: качественный и количественный.

В первом случае используют методы оценки качественных признаков микроорганизмов (морфологические, тинкториальные, культуральные свойства, жизнеспособность и др.). Условно их можно разделить на макроскопические и микроскопические:

– *макроскопические методы* основаны на сенсорном анализе визуальных, обонятельных, вкусовых, тактильных признаков микробиологических порчи с.-х. сырья и пищевых продуктов;

– *микроскопические методы* включают обнаружение и идентификацию возбудителей порчи с помощью микроскопии, изучение морфологических, тинкториальных свойств микроорганизмов, бактериоскопический анализ свежести продукции и др.

Количественный микробиологический анализ направлен на получение информации о трех основных аспектах анализируемых объектов: общем количестве (биомассе) микроорганизмов; их видовом составе и количественном содержании; физиологической и биохимической активности клеток.

В зависимости от точности измерений методы микробиологического анализа разделяют на количественные с относительной погрешностью менее 20%, полуколичественные – 20–40%, качественные – более 40% (рис. 1).

Все методы микробиологического анализа условно подразделяются на прямые и косвенные.



**Прямые методы** обеспечивают получение абсолютных значений микробиологических показателей. К ним относятся методы микроскопии, методы культивирования микроорганизмов, а также смешанные методы (микрокультивирование).

*Микроскопические методы* применяют для изучения живых или убитых микроорганизмов в окрашенном или неокрашенном виде. С помощью этого метода можно изучать морфологические свойства микроорганизмов: размеры, форму, взаиморасположение клеток, способность к движению, тинкториальные свойства (окрашивание красителями), указывающие на особенности строения клеточной стенки, наличие споро- и капсулообразования, присутствие клеточных включений, а также измерять количество клеток в поле зрения.



Рис. 1. Общая классификация методов микробиологического анализа

Методы наблюдения микроорганизмов с помощью микроскопа быстры, наглядны, доступны и широко используются для оценки высоких концентраций и крупных клеток.

Среди методов количественной микроскопии известны: метод подсчета клеток в счетных камерах, метод Виноградского – Брида, метод Королева и др.

*Методы посева и культивирования микроорганизмов* в жидких и агаризованных питательных средах просты, не требуют специального оборудования. В микробиологической практике они широко применяются для выделения чистых культур микроорганизмов и их хранения, анализа видового состава микроорганизмов, изучения культуральных свойств клеток (характер роста на плотных, жидких и полужидких питательных средах, цвет, форма, размеры, структура и консистенция колоний, состав питательных сред, на которых размножаются микроорганизмы).

Методы посева и культивирования также широко используются для количественного подсчета микроорганизмов. Они позволяют зарегистрировать присутствие одной делящейся клетки, однако длительны (3–5 сут), трудоемки, требуют большого расхода реактивов, экономически недостаточно эффективны и не для всех микроорганизмов применимы.

*Смешанные методы* используют для объединения достоинств микроскопических, культуральных и других методов и сокращения длительности микробиологического анализа. К ним относятся методы микрокультур клеток на агаровых пленках, мембранных фильтрах, определения биомассы взвешиванием и др.

*Косвенные методы* – обеспечивают получение относительных значений микробиологических показателей и включают: биофизические (биокалориметрия, импедансометрия, флуориметрия, хемилюминометрия и др.), биохимические (АТФ-метрия, энзимометрия, липидометрия, анализ продуктов жизнедеятельности микроорганизмов и др.), биологические (физиологические, иммунологические (серологические), биотестирование и др.) методы.

Они быстры, высокопроизводительны, мало- или безреагентны, однако в большинстве случаев требуют специального оборудования, обученного персонала, и для перевода их показаний в абсолютные значения необходима калибровка.

Широкое применение в микробиологии в последнее время находят молекулярно-генетические методы анализа (ПЦР реального времени, метод молекулярных зондов и др.), позволяющие провести видовую идентификацию микроорганизмов в течение нескольких

часов вместо нескольких недель при использовании классического микробиологического анализа.

Косвенные методы экономически более эффективны и быстро окупаются при большом количестве микробиологических анализов, поэтому они приходят на смену широко используемым методам культивирования микроорганизмов.

### **3.3. Качественный микробиологический анализ и морфологические свойства микроорганизмов**

#### **Лабораторная работа № 1**

#### **СВЕТОВАЯ МИКРОСКОПИЯ, ТЕХНИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ И ИХ МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА**

*Цель работы* – изучение устройства и характеристик светового микроскопа, освоение методов и техники приготовления препаратов для световой микроскопии и анализ морфологических свойств бактерий, дрожжей и мицелиальных грибов.

Световая микроскопия является широко распространенным методом прямого наблюдения микроорганизмов и изучения их свойств.

Различают следующие виды световой микроскопии: в проходящем свете, в отраженном свете.

Существует большое многообразие видов световой микроскопии в проходящем свете: в светлом поле; темном поле; фазово-контрастная; флуоресцентная; поляризационная; интерферометрическая и др. Наиболее часто в лабораторной практике используется микроскопия в светлом поле.

#### **1. Назначение и устройство светового микроскопа**

Световой микроскоп (рис. 2) предназначен для качественного и количественного анализа морфологических свойств микроорганизмов, определения размеров, формы и содержания микроорганизмов в поле зрения микроскопа.

Световой микроскоп состоит из трех основных частей: механической, оптической и электрической.

*Электрическая часть микроскопа* включает источник света, вилку с кабелем, выключатель.

*Механическая часть микроскопа* содержит следующие элементы: основание, штатив, несущий все детали микроскопа, предметный столик с зажимным устройством для размещения препаратов, кронштейн конденсора, тубусодержатель и бинокулярный тубус, несущий окуляры и внутреннюю систему поворотных линз, револьвер со сменными объективами. В механическую часть входят также винты грубой и тонкой настройки микроскопа, стопорные винты, винт конденсора, ирисовая диафрагма с винтом, предназначенная для изменения интенсивности светового потока.

*Оптическая часть микроскопа* состоит из окуляров с увеличением  $10\times$  или  $15\times$ , объективов с увеличением  $10\times$ ,  $20\times$ ,  $40\times$ ,  $90\times$  или  $100\times$ , конденсора из системы линз, собирающих рассеянный световой поток от источника излучения в параллельный пучок для равномерного освещения препарата.

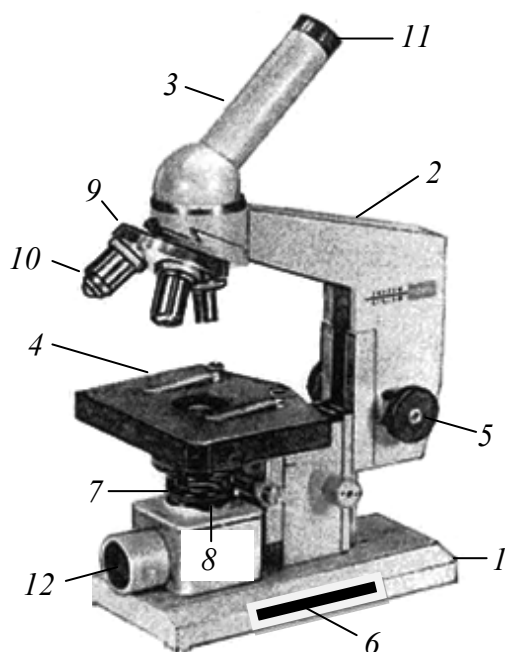


Рис. 2. Световой биологический микроскоп:

- 1 – основание; 2 – штатив; 3 – тубус;
- 4 – столик с зажимами; 5 – винт грубой настройки;
- 6 – винт тонкой настройки;
- 7 – система конденсора с диафрагмой, винтом подъема конденсора, светофильтром;
- 8 – дополнительная линза; 9 – револьвер;
- 10 – система объективов; 11 – окуляр;
- 12 – источник света

В оптическую часть микроскопа входит также призма тубуса, поворачивающая световой поток, прошедший через образец, под удобным углом для наблюдателя.

## 2. Количественные характеристики светового микроскопа

1. *Общее увеличение микроскопа* определяется произведением увеличения окуляра на увеличение объектива:

$$V = V_{об} \cdot V_{ок}; \quad (1)$$

$$V_{ок} = l_o / f_{ок}; \quad (2)$$

$$V_{об} = l / f_{об}, \quad (3)$$

где  $l_o$  – расстояние наилучшей видимости (25 см);  $f_{ок}$  – фокусное расстояние окуляра;  $l$  – оптическая длина тубуса микроскопа;  $f_{об}$  – фокусное расстояние объектива.

Предельное увеличение размеров объекта в обычном световом микроскопе не превышает 2000 раз.

В современных дорогих микроскопах достигается более высокое увеличение, за счет использования дополнительных увеличивающих линз в тубусе микроскопа:

$$V = V_{об} \cdot V_{ок} \cdot V_{туб}; \quad (4)$$

$$V_{туб} = l / f_{туб}, \quad (5)$$

где  $f_{туб}$  – фокусное расстояние линзы тубуса.

Лучшие микроскопы Leica DM LS, DM LB используют в зависимости от задач объективы ( $1 \div 200\times$ ), окуляры  $15\times$  и позволяют добиваться увеличения до 6400.

Следует помнить, что чем больше увеличение объектива, тем меньше глубина резкости и поле зрения.

2. *Разрешающая способность* определяется наименьшим расстоянием между двумя точками ( $d$ ), которое можно различить.

Разрешающая способность микроскопа не зависит от окуляра и его увеличения, а определяется характеристиками объектива, поэтому разрешение и общее увеличение – независимые величины.

Из дифракционной теории следует, что  $d$  может быть выражено через длину волны наблюдаемого излучения и среднюю апертуру:

$$d = \lambda / A, \quad (6)$$

где  $\lambda$  – длина волны света, мкм;  $A = (A_1 + A_2) / 2$ ;  $A_1$  – апертура объектива;  $A_2$  – апертура конденсора.

3. *Апертура* – безразмерная величина, определяющая яркость изображения, глубину резкости видения и численно равная

$$A = n \cdot \sin(\alpha / 2), \quad (7)$$

где  $n$  – показатель преломления между оптическим элементом и средой;  $\alpha$  – отверстиеный угол (рис. 3).

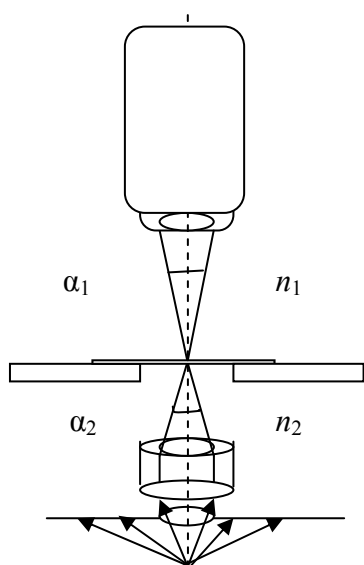


Рис. 3. Апертура объектива и конденсора светового микроскопа

Диапазон апертур объективов изменяется от  $A = 0,025 (\times 10)$  до  $A = 1,45$  (иммерсионный объектив).

Увеличить разрешающую способность микроскопа можно путем выбора правильного объектива, уменьшения длины волны наблюдения или за счет увеличения показателя преломления среды, используя иммерсионную систему: воздух –  $n = 1,0$ ; вода –  $n = 1,333$ ; масло –  $n = 1,52$ . Сухой иммерсионный объектив имеет апертуру  $A = 1,0$ . Это дает разрешение  $0,3$  мкм для длины волны  $560$  нм. Для иммерсионного объектива, помещенного в масло,  $A = 1,45$  и предельная разрешающая способность составляет  $0,12$  мкм.

4. *Глубина дифракционной резкости изображения ( $T$ )* – расстояние между двумя плоскостями, лежащими одна под другой, между которыми все части измеряемого объекта четко видны.

$$T = 10^3 / (V \cdot 7 \cdot A) + n \cdot \lambda / (2 \cdot A^2), \quad (8)$$

Для увеличения глубины изображения можно уменьшить увеличение микроскопа ( $V$ ) за счет использования объектива с меньшим увеличением или путем применения красного или желтого светофильтров.

С целью подбора правильных сочетаний увеличения окуляра и объектива для получения необходимой глубины резкости рассчитывают полезное увеличение окуляра ( $V_{\text{ок}}^{\text{п}}$ ):

$$V_{\text{ок}}^{\text{п}} = (500 \cdot A \div 1000 \cdot A) / V_{\text{об}}. \quad (9)$$

### 3. Правила работы со световым микроскопом

Для правильной работы светового микроскопа необходимо соблюдать ряд правил.

1. Установить световой микроскоп на столе, не далее 10–15 см от его края. Высоту стульев подобрать таким образом, чтобы спина не находилась в напряженном состоянии при работе с микроскопом.

2. Включить микроскоп и настроить его по Келлеру:

- поднять конденсор вверх;
- закрыть диафрагму конденсора;
- убрать светособирающую линзу из-под конденсора;
- установить самый малый объектив;
- прикрыть источник бумагой и добиться максимальной освещенности нити источника, перемещая патрон с лампой до максимальной видимости нити;
- приоткрыть диафрагму конденсора и настроить микроскоп на резкость на любом препарате макро- и микровинтами;
- опустить немного конденсор до появления неровного освещения поля зрения. Перемещая конденсор, добиться четкого изображения границы темное/светлое поле;
- открыть диафрагму осветителя, совмещая ее изображение с полем зрения микроскопа;
- вынуть окуляр из тубуса и, глядя в микроскоп, открыть диафрагму конденсора до совмещения освещенного круга с полем зрения окуляра;
- поставить окуляр в тубус;

Для повышения контрастности конденсор можно опустить немного вниз или прикрыть его диафрагму. Однако тогда разрешающая способность объектива не будет использоваться полностью.

3. Поместить предметное стекло с препаратом на столик микроскопа и зафиксировать его зажимами.

4. Установить необходимый объектив, поворачивая револьвер при поднятом кронштейне.

Для работы с крупными образцами (мицелиальные грибы) используются объективы на  $\times 8$ ,  $\times 10$ . Они имеют максимальную глубину резкости. Для работы с клетками средних размеров (дрожжи, простейшие) применяются объективы на  $\times 20$ ,  $\times 40$ .

При работе с мелкими микроорганизмами (бактерии) используют объективы на  $\times 90$ ,  $\times 100$ , а также масляную иммерсионную систему.

5. Настройка микроскопа на резкость проводится вначале грубым винтом до обнаружения изображения в фокальной плоскости, а затем тонким винтом для получения его максимальной резкости.

Фокальная плоскость для объективов на 8×, 10× находится на уровне 10–12 мм от поверхности препарата; для объективов 20×, 40× – 6–3 мм; 90×, 100× – 0,1 мм.

При работе с объективами большого увеличения необходимо вращать грубый винт очень плавно, чтобы не пропустить появление изображения в фокальной плоскости.

6. При работе с иммерсионным объективом на препарат стеклянной палочкой наносится маленькая капля иммерсионного масла, после чего объектив помещается в нее и фокусируется. При использовании большой капли масла резкость изображения снижается. По окончании работы с иммерсионной системой необходимо удалить остатки масла с линзы объектива и тщательно протереть ее фланелью.

7. При рассмотрении изображения в микроскоп следует обращать внимание на размеры, форму, взаиморасположение микроорганизмов, их окраску, зарисовывая препараты в тетради или фотографируя их с помощью цифровой фотокамеры мобильного телефона. Для этого цифровая камера настраивается на работу с микрообъектами, подносится к окуляру микроскопа, после чего изображение фокусируется и фиксируется в памяти камеры.

8. Хранить микроскоп необходимо в укрытом состоянии, защищая оптику от попадания пыли и грязи, способствующих развитию микроорганизмов на оптических деталях. По окончании работы устанавливается минимальное увеличение объектива, конденсор и тубус микроскопа опускаются вниз до упора и микроскоп укрывается полиэтиленовым пакетом.

Существует ряд способов быстрой проверки степени загрязнения оптики микроскопа. Окуляр загрязнен, если при его повороте в тубусе одновременно вращается и полученное изображение. Объективы загрязнены, если при сдвиге столика с образцом изображение остается без изменений.

В случае загрязнения оптики микроскопа необходимо достать окуляр, объектив и протереть их чистой фланелью, а если это не помогает – обработать смесью спирта и сернистого эфира в соотношении 1 : 1 для удаления жировых загрязнений.

После каждого сеанса работы с иммерсионным объективом в конце работы необходимо обеззараживать его 75%-ным спиртом.



#### 4. Техника приготовления препаратов для световой микроскопии

Морфологию микроорганизмов можно изучать на живых и неживых препаратах клеток.

Для исследования микроорганизмов в живом состоянии используют методы «раздавленной капли» и «висячей капли», для анализа микроорганизмов в неживом состоянии используют метод приготовления «фиксированных мазков».

##### *Ход работы*

*Приготовление препарата «раздавленная капля».* Метод «раздавленной капли» используют для кратковременного (менее 15 мин) наблюдения за морфологическими свойствами, жизнеспособностью подвижных и неподвижных микроорганизмов.

1. Для приготовления препарата «раздавленная капля» на предметное стекло помещают каплю воды или физиологического раствора (ФР) с помощью стеклянной палочки.

2. Стерильной петлей отбирают с чашки Петри колонию микроорганизмов, вносят ее в каплю жидкости, размешивают и накрывают покровным стеклом. Для уменьшения попадания пузырьков воздуха покровное стекло вначале ставят ребром на предметное стекло, а затем плавно опускают, придавливая каплю. При правильном приготовлении препарат имеет не слишком густую консистенцию и не слишком разбавлен, не содержит частицы питательной среды. Излишки влаги удаляют фильтровальной бумагой.

3. Препарат просматривают с помощью светового микроскопа при увеличении: для грибов – 10×20, дрожжей – 10×40, бактерий – 10×90, а также с помощью имерсионной системы.

4. Изучение морфологических особенностей мицелиальных грибов проводят с объективом 8× непосредственно на чашках Петри.

5. Затем с помощью препаративной иглы вырезают кусочек мицелия (0,5 мм<sup>2</sup>) и помещают в каплю воды на предметном стекле.

6. Поскольку споры грибов не смачиваются водой, в каплю воды добавляют этиловый спирт или уксусную кислоту (1 : 1).

7. Образец покрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом с объективами 20× или 40× на краю препарата.

8. В препарате «раздавленная капля» спорангий грибов осыпается. Для анализа неразрушенного спорангия отбирают иглой часть мицелия грибов, помещают его на сухое предметное стекло

и рассматривают без покровного стекла. Из-за малой глубины резкости объективов с большим увеличением грибы надо рассматривать при малом увеличении для получения полного изображения.

*Приготовление препарата «висящая капля».* Этот метод используется при продолжительном наблюдении (несколько часов) за развитием и размножением, подвижностью микроорганизмов, прорастанием спор. Для приготовления препарата «висящая капля» применяется предметное стекло с лункой посередине. Вначале на покровное стекло по центру наносят маленькую каплю суспензии изучаемого микроорганизма. Затем покровное стекло переворачивают каплей вниз и вносят в лунку предметного стекла так, чтобы капля свободно висела в лунке, не касаясь ее стенок. Для длительного наблюдения края лунки смазывают вазелином для образования влажной камеры, в которой не происходит быстрого испарения влаги и микроорганизмы остаются в жизнеспособном состоянии длительное время.

3. Препарат рассматривается под микроскопом при увеличении объектива не выше 40×.

*Метод приготовления «фиксированных мазков».* Метод «фиксированных мазков» широко применяется на практике в медицине, в микробиологии для изучения морфологических, тинкториальных свойств микроорганизмов, изучения органелл клеток, оценки степени чистоты культур, подсчета численности клеток и др. На чистое и обезжиренное с помощью кусочка мыла предметное стекло бактериальной петлей наносят каплю суспензии изучаемого микроорганизма. Распределяют каплю по поверхности стекла петлей или сдвигая краем другого предметного стекла на площади 4 см<sup>2</sup>. Мазок высушивают на воздухе или в токе теплого воздуха над спиртовкой, держа мазком вверх. Хорошо приготовленный мазок выглядит как едва заметный налет. Высушенный препарат фиксируют, пронося его 3–4 раза через пламя горелки, контролируя температуру (60–70°C) предметного стекла касанием тыльной стороны ладони. Отмечается терпимое жжение ладони, при перегреве – сильное жжение, при котором может наблюдаться деформация клеток и изменение их формы.

Фиксация препаратов проводится с целью:

– быстро убить микроорганизмы (при медленной гибели клетки выбрасывают автолитические ферменты, изменяющие их структуру);

- денатурировать белки и повысить адгезию клеток к стеклу;
- улучшить тинкториальные свойства клеток, повысить их про- ницаемость для красителей и увеличить прочность их связывания.

Основные ошибки в приготовлении мазков связаны с получением слишком густых или разведенных препаратов; недостаточной их фиксацией и смывом; излишней фиксацией деформирующей клетки.

### **5. Методы биологического окрашивания микроорганизмов и их органелл**

Микроорганизмы в большинстве случаев прозрачны, поэтому для увеличения контрастности их изображения, анализа жизнеспособности клеток, а также для изучения отдельных органелл используют методы биологического окрашивания.

В зависимости от природы красителей их разделяют:

- на катионные, обладающие свойствами оснований (нейтральный красный, сафранин, фуксин основной, метиленовый синий, кристаллический фиолетовый и др.);

- анионные, имеющие свойства кислот (фуксин кислый, эозин, эритрозин, флуоресцеин и др.).

В зависимости от свойств молекул и органелл клеток они по-разному окрашиваются катионными и анионными красителями. Например, ДНК, обладающая анионными свойствами, хорошо взаимодействует с катионными красителями: акридиновым оранжевым, сафранином, а цитоплазма клеток обладает щелочной реакцией и хорошо окрашивается анионными красителями – фуксином кислым и др.

При окраске живых микроорганизмов используют витальные красители в концентрациях, не нарушающих жизнеспособность клеток. Они способны проникать внутрь микроорганизмов и участвовать в биохимических реакциях, по-разному окрашивая живые и неживые клетки. В качестве витальных красителей применяют: метиленовый синий, нейтральный красный, толуидиновый синий, нильский голубой, конго красный, фуксин и их сочетания.

**Простые методы окрашивания микроорганизмов.** Для простых методов окрашивания применяют один краситель. Простые методы окрашивания микроорганизмов используют как для увеличения контрастности клеток, оценки их жизнеспособности, изучения внутриклеточных компонентов (хромосомы, ДНК, РНК, ферменты), измерения рН, мембранного потенциала митохондрий,

так и для наблюдения неживых микроорганизмов и изучения их морфологических свойств, наличия отдельных органелл.

Процентное содержание живых и неживых клеток в суспензии может быть определено колориметрическим методом по их разной способности к окрашиванию. Установлено, что живые и мертвые клетки микроорганизмов не в одинаковой степени способны к поглощению красителей из растворов. Можно подобрать условия, при которых красители преимущественно адсорбируются только мертвыми клетками.

Выявление в микробных ценозах живых и мертвых клеток можно осуществить также с помощью люминесцентной микроскопии. Люминесцентно-микроскопический метод универсален и применяется для контроля жизнеспособности бактерий, дрожжей, грибов и актиномицетов. При окрашивании микроорганизмов акридиновым оранжевым мертвые клетки приобретают красное свечение, а живые – зеленое. Метод приобрел вначале большое распространение, так как обладает на два порядка большей чувствительностью, чем колориметрические методы. Однако вскоре выяснилось, что сам краситель вызывает гибель клеток. В дальнейшем были предложены менее токсичные флуорохромы, такие как примулин, тиазоловый желтый, бриллиант-дианиловый зеленый, флуоресцеин-изотиоцианат, фенол-анилиновый синий, 1-анилино-8-нафталин-сульфоновая кислота, флуорексамин, применение которых в концентрации 1 : 100 хорошо согласуется с результатами анализа клеток культуральными методами.

Для выявления мертвых бактерий наилучшими флуорохромами являются примулии, тиазоловый желтый. При флуорохромировании этими красителями в разведении 1 : 100 000 мертвые клетки ярко люминесцируют, а живые почти не светятся.

Процент жизнеспособности (ПЖ) микроорганизмов определяется исходя из разного свечения живых и неживых клеток по формуле

$$\text{ПЖ} = a / (a + b) \cdot 100 (\%), \quad (10)$$

где  $a$  – количество живых клеток в поле зрения микроскопа;  $b$  – количество неживых клеток.

В настоящее время люминесцентный метод в сочетании с мембранными фильтрами и компьютерной техникой обработки видеоизображений окрашенных клеток в поле зрения микроскопа интенсивно используется в экологических исследованиях для вы-

явления жизнеспособных микроорганизмов воды, почвы, а также в пищевой микробиологии.

### *Ход работы*

1. Для окраски неживых микроорганизмов вначале готовят фиксированный мазок.

2. Затем предметное стекло с фиксированным препаратом помещают на параллельные рейки над ванночкой. Мазок покрывают кусочком фильтровальной бумаги и капают на него 1%-ный раствор фуксина (окрашивает в красный цвет) или метиленового синего. Фильтровальная бумага позволяет равномерно распределить краситель по поверхности образца. Окрашивание проводят на протяжении 2–3 мин, после чего фильтр снимают.

3. По окончании окрашивания препараты промывают водой и высушивают.

4. Просматривают образцы под микроскопом и в случае необходимости используют иммерсионную систему. Препараты зарисовывают или фотографируют.

5. Окраску живых микроорганизмов и оценку их жизнеспособности проводят с помощью индикаторных красителей. Для этого готовят десятикратное разведение суточной культуры клеток в питательном бульоне (ПБ).

6. В две пробирки вносят по  $1 \text{ см}^3$  разведения микроорганизмов, в одну пробирку добавляют 1 : 1 редокс-краситель метиленовый синий ( $C = 0,001\%$ ), в другую – рН-индикатор бромтимоловый синий ( $C = 0,02\%$ ).

7. Пробирки помещают в термостат при  $37^\circ\text{C}$  на 1 ч, после чего по изменению цвета красителей судят о жизнеспособности микроорганизмов.

**Сложные методы окрашивания микроорганизмов.** Для окраски микроорганизмов сложными методами используется пара красителей, селективно окрашивающих вегетативное тело и органеллы клеток. Сложные методы окрашивания микроорганизмов применяют для изучения морфологических свойств клеток, обнаружения капсул, спор, изучения строения клеточной стенки, наблюдения внутриклеточных образований.

#### *1. Окрашивание клеточных стенок бактерий по методу Грама*

Клеточная стенка бактерий выполняет защитную функцию. Она изменялась в процессе эволюции микроорганизмов. Известны

три типа клеточных стенок (КС): 1) КС Гр (+) бактерий; 2) КС Гр (–) бактерий; 3) КС микроорганизмов не содержащих муреин. На рис. 4 приведено строение клеточных стенок Гр (+) и Гр (–) бактерий. Они состоят из трех слоев: липополисахаридов, липопротеинов и муреина. У Гр (+) бактерий на долю муреинового слоя приходится 80% толщины КС, у Гр (–) – 20%.

Метод Грама основан на разной прочности связывания комплекса, образованного красителем генциановым фиолетовым и раствором Люголя с муреиновым слоем клеток, при их вымывании спиртом. Последующее докрасивание вегетативных тел клеток фуксином придает Гр (+) бактериям красный, а Гр (–) синий цвет.

Основными представителями Гр (+) микроорганизмов являются бактерии родов *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*. К Гр (–) бактериям относятся бактерии группы кишечной палочки, сальмонеллы, псевдомонады и др.

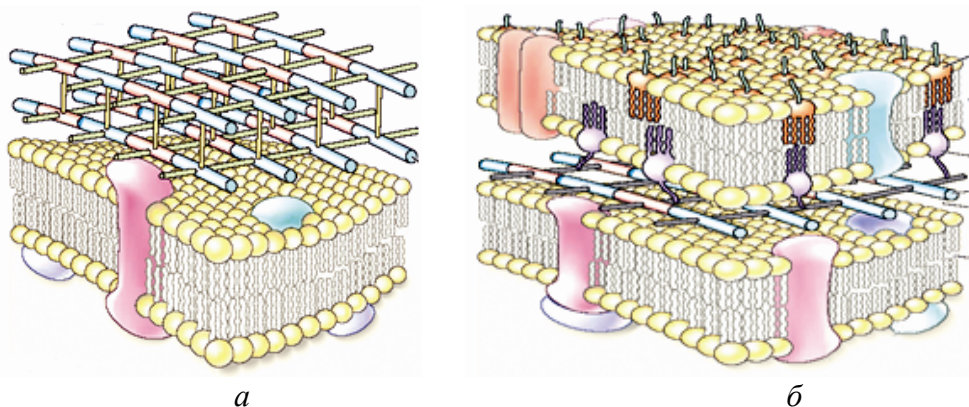


Рис. 4. Строение клеточных стенок Гр (+) (а) и Гр (–) бактерий (б)

### Ход работы

1. Для окраски бактерий по Граму готовят фиксированный мазок изучаемых культур микроорганизмов.
2. Образец окрашивают карболовым раствором красителя генцианового фиолетового 1–2 мин.
3. Не промывая образец водой, добавляют раствор Люголя, выдерживают 1–2 мин до возникновения черных гранул.
4. Сливают раствор Люголя и обесцвечивают 96%-ным спиртом в течение 15–30 с, после чего препарат промывают водой.
5. Далее образец докрасивают 1–2 мин водным раствором основного фуксина, промывают водой и высушивают.

6. Микроскопируют образец с иммерсионной системой.

Результаты анализа во многом зависят от времени обработки образцов спиртом. При недостаточной длительности обработки все микроорганизмы сохраняют синее окрашивание, при избыточной – все окрашиваются в красный цвет.

Старые культуры клеток могут изменять свои свойства окраски по Граму, поэтому для анализа необходимо использовать молодые культуры клеток.

*2. Окрашивание спор микроорганизмов по методу Шеффера – Фултона*

Спорообразование наблюдается не у всех бактерий и характерно для бацилл, клостридий и ряда других микроорганизмов.

У бактерий спорообразование не является способом размножения клеток, а служит способом переживания неблагоприятных условий.

Споры бактерий до миллиона раз более устойчивы к неблагоприятным факторам среды, чем вегетативная форма клеток. Они содержат все необходимое для возрождения клеток и, попадая в благоприятные условия среды, прорастают и образуют вегетативное тело клетки.

Споры бактерий могут располагаться по центру или по краям клетки, превышать диаметр клетки, образуя форму теннисной ракетки или вздутой палочки (клостридии) или находиться в пределах палочковидной формы (бациллы).

### ***Ход работы***

1. Готовят мазок спорообразующих микроорганизмов.

2. Наносят на образец 5–6 капель 5%-ного малахитового зеленого и нагревают над пламенем спиртовки до появления паров.

3. Препарат охлаждают и промывают водой до прекращения смыва красителя.

4. Докрашивают образец 0,5%-ным раствором сафранина в течение 1–2 мин, после чего промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой.

Споры и вегетативное тело клеток окрашиваются в разные цвета (рис. 5).

*3. Окрашивание капсул бактерий по методу Гинса – Бурри*

Часть бактерий образует вокруг себя дополнительный защитный слой – капсулу из полисахаридов, покрывающую всю клетку или отдельную ее часть и защищающую ее от обезвоживания, а также регу-

лирующую поступление веществ в клетку. К таким микроорганизмам относятся бактерии *Azotobacter*, *Leuconostoc*, *Pneumonococcus* и др.

### *Ход работы*

1. На обезжиренное предметное стекло наносят каплю водного раствора фуксина и вносят в нее петлей культуру бактерий.

2. Рядом размещают каплю туши и обе капли перемешивают.

3. С помощью второго предметного стекла делают мазок.

4. Высушивают его и микроскопируют с иммерсионной системой.

В результате на темно-дымчатом фоне препарата наблюдают розовые клетки с прозрачной капсулой (рис. 5).

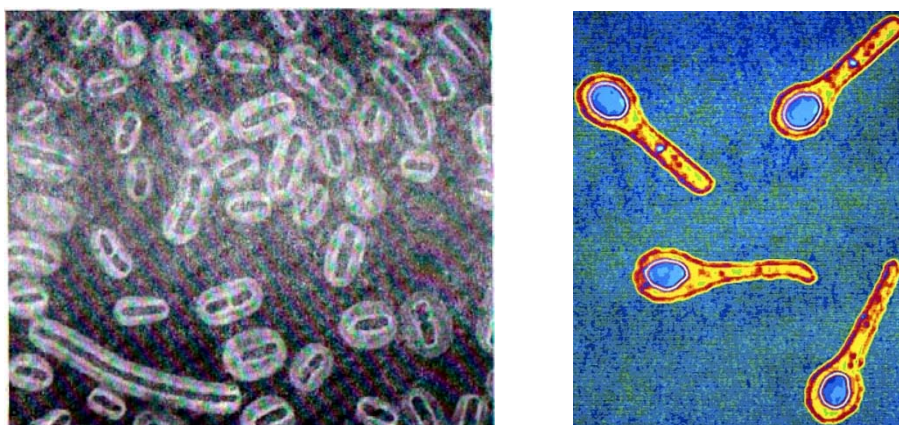


Рис. 5. Капсулы *Bacillus megaterium* и эндоспоры *Clostridium sp.*

## **6. Наблюдение препаратов микроорганизмов методом микроскопии в светлом поле**

### *Ход работы*

Вначале работы изучают расположение частей светового микроскопа и настраивают его освещение по Келлеру, добиваясь максимального разрешения и оптимальной освещенности образцов.

Для освоения навыков настройки микроскопа вначале используют образцы индивидуальных волос, которые укладывают на предметное стекло, фиксируют с помощью нанесения по краям каплю воды, помещают на предметный столик, устанавливают наименьший объектив, фокусируют изображение и рассматривают его под микроскопом по всей длине образца. После этого изменяя настройки микроскопа и устанавливая разные объективы, добиваются максимального увеличения образца.



Далее на приготовленных заранее препаратах мицелиальных грибов, дрожжей и бактерий отрабатываются навыки фокусирования микроскопа и изучения морфологических свойств микроорганизмов.

При наблюдении мелких бактерий используется иммерсионная система с кедровым маслом. Всего просматривается по 3 вида чистых культур бактерий, дрожжей и грибов. Полученные результаты фотографируются или зарисовываются в тетрадь.

**1. Бактерии.** Это наиболее широко распространенная и разнообразная в видовом отношении группа микроорганизмов. Форма бактерий не является абсолютно постоянной, она способна изменяться под влиянием среды обитания. Эти изменения ненаследственные и называются модификациями. Однако при определенных условиях микробы обладают способностью сохранять присущие данному виду морфологические свойства, приобретенные ими в процессе эволюции.

По внешнему виду бактерии подразделяются на три основные формы: шаровидные, палочковидные и извитые.

*Кокки* – шаровидные бактерии диаметром 1–2 мкм, различающиеся направлением деления клеток, количеством и взаимным их расположением (рис. 6). Все кокки неподвижны и не образуют спор.

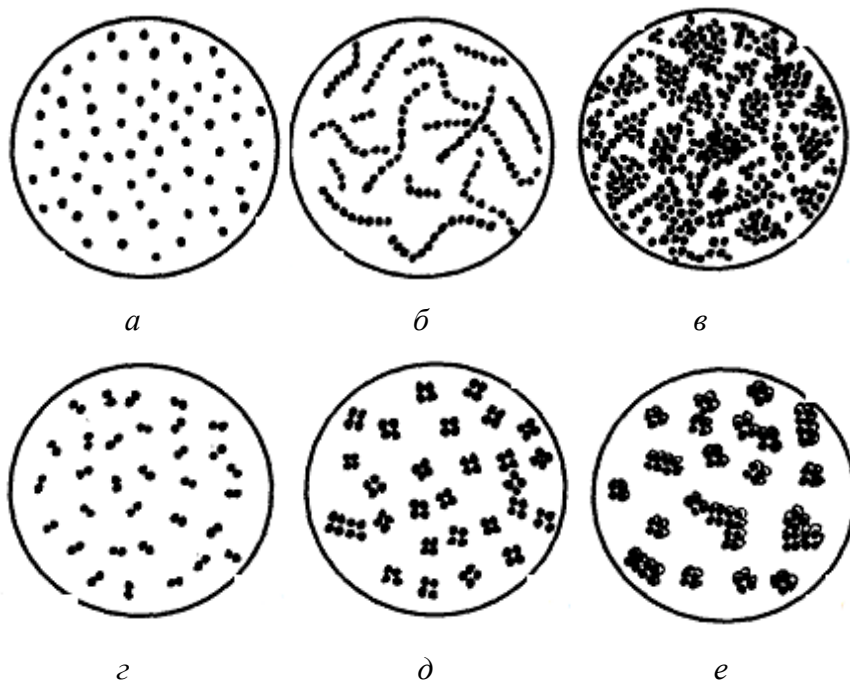


Рис. 6. Взаиморасположение кокков:  
*a* – микрококки; *б* – диплококки; *в* – стрептококки;  
*г* – тетракокки; *д* – стафилококки; *е* – сарцины

В зависимости от направления деления и взаиморасположения клеток кокковые формы делятся:

- на *микрোকки* (клетки располагаются поодиночке);
- *диплококки* (располагаются попарно, деление клетки происходит в одной плоскости);
- *стрептококки* (располагаются в виде цепочек, деление клеток происходит в одной плоскости, причем клетки после деления не отделяются друг от друга);
- *стафилококки* (скопления кокков неправильной формы, напоминающих гроздь винограда, деление клеток осуществляется в трех плоскостях);
- *тетракокки* (делятся в двух взаимно перпендикулярных плоскостях и образуют скопления из четырех клеток);
- *сарцины* (имеют вид скоплений кубической формы по 4, 8 клеток, делятся в трех взаимно перпендикулярных плоскостях).

*Палочковидные бактерии* (рис. 7) имеют форму вытянутого цилиндра и различаются:

- размерами (длиной и толщиной); средняя длина палочковидных бактерий составляет 2–7 мкм при диаметре 0,5–1 мкм. Однако есть как более крупные формы, так и очень мелкие, величина которых находится на грани видимости в обычные световые микроскопы (0,1–0,2 мкм);
- взаимным расположением клеток; палочковидные бактерии могут располагаться поодиночке, попарно (диплобактерии) и цепочками (стрептобактерии);
- палочки бывают спорообразующие и неспорообразующие; спорообразующие палочки делятся на бациллы и клостридии;
- палочковидные бактерии бывают подвижные и неподвижные; клетки подвижных форм палочковидных бактерий снабжены специальными приспособлениями для движения – жгутиками.

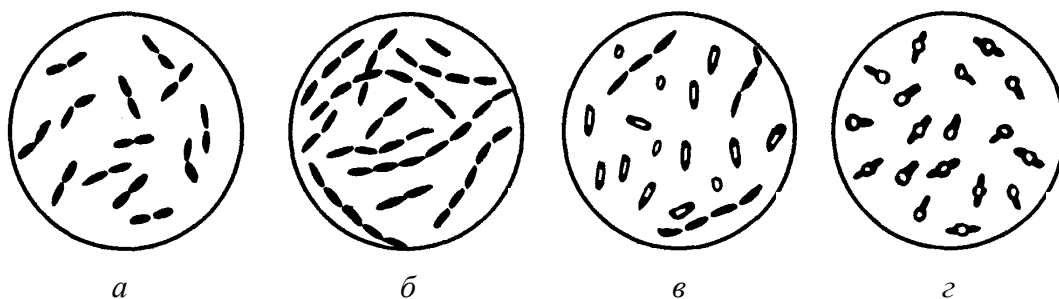


Рис. 7. Морфология палочковидных бактерий:

*а* – диплобактерии; *б* – стрептобактерии; *в* – бациллы; *г* – клостридии

*Извитые формы бактерий.* Извитые формы бактерий в зависимости от степени изогнутости подразделяются на вибрионы, спириллы и спирохеты. Вибрионы имеют вид запятой, самые мелкие из извитых форм. Длина клетки вибрионов не превышает 1–3 мкм. Клетки спирилл имеют длину от 5 до 30 мкм и один или несколько завитков. Клетки спирохет имеют 20–30 завитков и характеризуются малым диаметром клетки (0,1–0,6 мкм) при большой ее длине (5–500 мкм).

Все извитые формы подвижны. Движение осуществляется с помощью жгутиков (у вибрионов и спирилл) или за счет сокращения всей клетки (у спирохет).

**2. Грибы.** Это эукариотические организмы, представленные в основном макромицетами (шляпочные грибы) и микромицетами (дрожжи и плесени) и относящиеся к царству *Mycota*. Грибы обладают высокой степенью гетерогенности морфологических признаков и свойств, характерных для растений (верхушечный рост, наличие клеточной стенки, неподвижность, вакуоли с клеточным соком), животных (гетеротрофный тип питания, отсутствие хлорофилла, запасание гликогена, способность к синтезу хитина) и бактерий (способность образовывать споры).

В соответствии с принятой в настоящее время систематикой грибов, основанной на способе их размножения, наличии септированного мицелия, грибы подразделяются на четыре отдела: *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Deuteromycota*. Среди эумицетов различают низшие (зигомицеты) и высшие (аскомицеты, базидиомицеты, несовершенные) грибы.

*Зигомицеты* имеют хорошо развитый несептированный мицелий. Типичным представителем зигомицетов является *Mucor*. Его мицелий образует структуры двух типов – разветвленные поверхностные гифы (ризоиды), проникающие в субстрат, и воздушные гифы – спорангиеносцы, расширяющиеся кверху, образуя округлый спорангий, отделенный от остальной части мицелия перегородкой. Внутри спорангия развивается большое количество эндоспор, служащих для бесполого размножения (рис. 8).

Зигомицеты обладают также половым способом размножения, при котором (+) и (–) гифы при контакте образуют зигоспору. При прорастании зигоспоры происходит мейотическое деление клеток и появляется гифа, образующая спорангий.

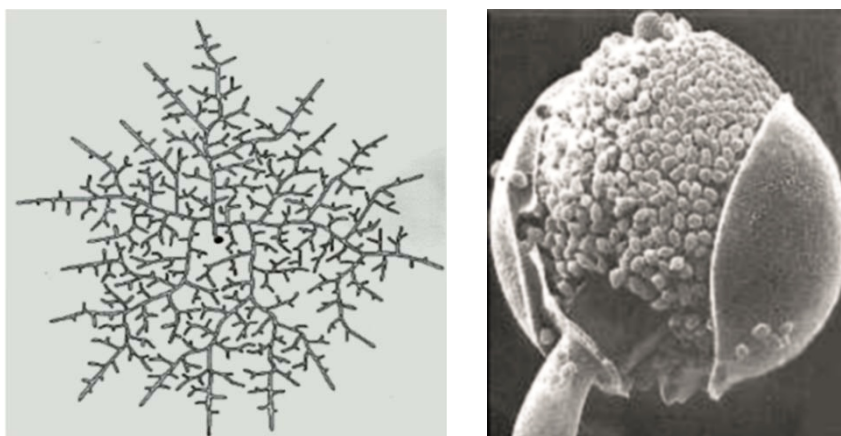


Рис. 8. Мицелий колонии грибов и митоспорангий *Mycor sp.*

*Аскомицеты* имеют многоклеточный ветвящийся мицелий. Клеточные перегородки имеют поры, что позволяет цитоплазме перетекать по всему мицелию. Для аскомицетов характерно чередование полового и бесполого размножения. При половом процессе слияние ядер клеток приводит к образованию зиготы, которая превращается в аск (сумку), внутри его в результате мейотического деления образуются гаплоидные аскоспоры (от 4 до нескольких тысяч). При бесполом размножении на концах плодоносящих гиф – конидиеносцах образуются экзоспоры – конидии. К аскомицетам относятся многие виды мицелиальных грибов и дрожжей.

*Аспергиллы* (*Aspergillus*) – род высших плесневых грибов, которые могут вызывать заболевания человека и животных (аспергиллёзы). Чаще всего их обнаруживают на различных продуктах, главным образом растительного происхождения, где колонии их образуют плесневые налеты разного цвета, особенно часты голубовато-зеленые, реже – других цветов. Колонии аспергиллов появляются на хлебе, хранящемся при повышенной влажности, на варенье и др. Большинство видов аспергиллов – сапрофиты. Вегетативное тело аспергиллов – очень ветвистый мицелий, пронизывающий субстрат и образующий обильный воздушный мицелий. У большинства аспергиллов плесневый налет состоит из конидиеносцев с конидиями (рис. 9).

Верхняя часть конидиеносца вздувается, образуя пузырь, на котором радиально размещаются флажковидные клетки – фиалиды, из узкого горлышка которых выходят одна за другой, располагаясь в цепочку, одноклеточные конидии. Чем выше по цепочке, тем конидии крупнее, интенсивнее окрашены и более зрелы. Зрелые конидии

имеют определенную форму и окраску. По мере созревания конидии отваливаются, переносятся на новые места и прорастают при благоприятных условиях, образуя мицелий. Это бесполой способ размножения аспергиллов. Однако некоторым из них свойственно и высшее спороношение – сумчатое (половое). В колониях таких видов бывают заметны невооруженным глазом маленькие шарики желтого цвета – клейстотеции, являющиеся плодовыми телами.

*Aspergillus niger* наиболее активно используемые в промышленности и в лабораторных исследованиях. Они развиваются на зерне во время его хранения, на плодах, овощах, хлопчатобумажных изделиях, коже и материалах, богатых белками. *A. niger* образует колонии сначала белоснежные, затем они приобретают темно-коричневую или черную окраску, у края более светлую. Конидиеносцы не септированные, с круглым утолщением на конце, диаметром около 80 мкм. Разветвленные стеригмы (первичные – длинные и узкие, вторичные – короткие) располагаются вокруг утолщения. Конидии мелкие, круглые, сначала гладкие, затем шероховатые, темно-коричневого цвета.

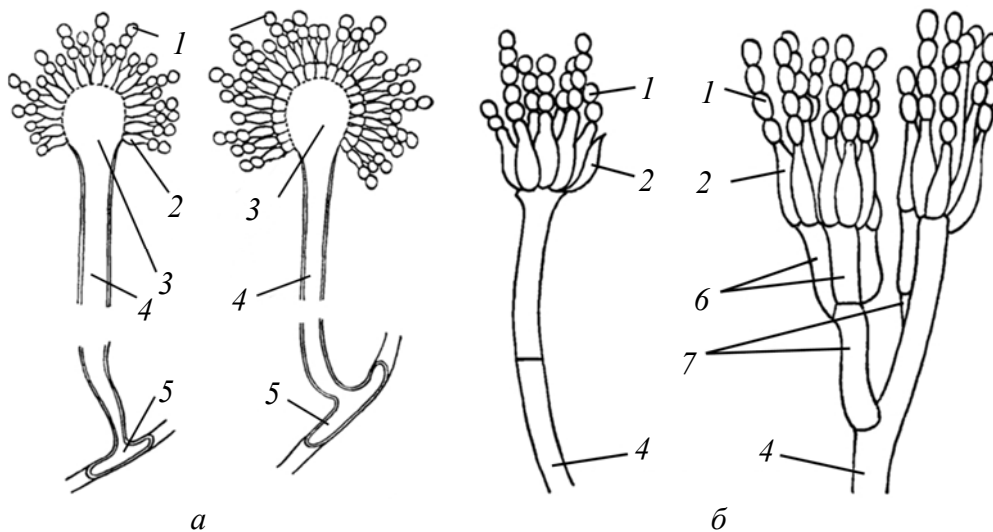


Рис. 9. Строение аспергилловой (а) и пеницилловой (б) плесеней:  
1 – конидии; 2 – филаиды; 3 – профилаиды; 4 – конидиеносцы;  
5 – опорные клетки; 6 – матулы; 7 – веточки

Штаммы *A. niger*, выделенные из заплесневелых кормов, оказались токсичными для животных. Большинство грибов, в том числе и аспергиллы, активно растут на органических материалах при низких значениях рН.

Пенициллы, как и аспергиллы, наиболее часто обнаруживаются в виде плесневых налетов, состоящих в основном из конидиеносцев с конидиями, на самых разных материалах и пищевых продуктах, главным образом растительного происхождения. Мицелий пенициллов в общих чертах не отличается от мицелия аспергиллов. Он бесцветный, многоклеточный, ветвящийся. Основное различие между этими двумя близкими родами заключается в строении конидиального аппарата. У пенициллов он более разнообразен и представляет собой в верхней части кисточку различной степени сложности (отсюда его синоним «кистевик» (рис. 9). В морфологии, онтогенезе и других особенностях аспергиллов и пенициллов имеется очень много общего, что позволяет предполагать их филогенетическую близость.

Большой вред плодам причиняют *P. digitatum* (зеленая гниль), *P. italicum* (сине-зеленая гниль), *P. expansum* «коричневая гниль». Имея широкий набор ферментов, пенициллы заселяют различные субстраты и принимают самое активное участие в аэробном разрушении продуктов.

*Trichoderma* относится к мезофилам с оптимальной температурой роста 25–35°C. В связи с высокими антагонистическими свойствами грибов рода *Trichoderma* они все шире применяются в качестве биологического средства борьбы с болезнями овощных, плодовых, декоративных и лесных культур.

*Несовершенные грибы* – большая группа грибов, включающих как одноклеточные, так и многоклеточные мицелиальные формы. Общим для них является отсутствие половой стадии размножения. Дрожжи являются одноклеточными грибами, но в неблагоприятных условиях они способны образовывать псевдомицелий (рис. 10).

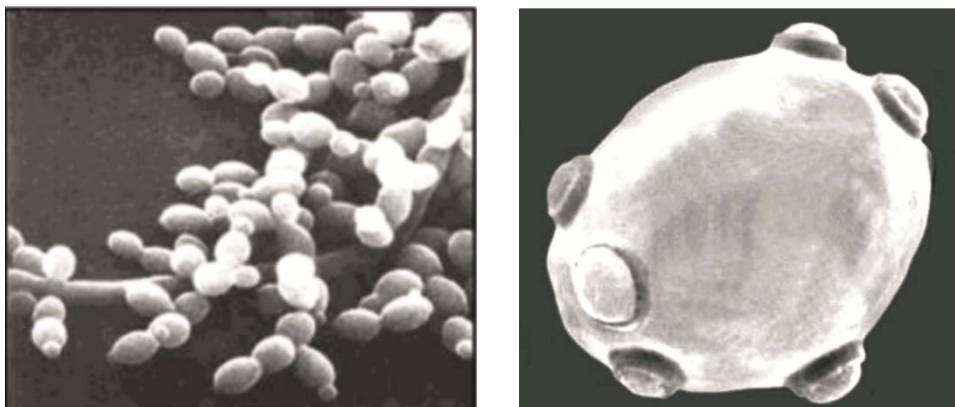


Рис. 10. Ложный мицелий почкующихся дрожжей *Candida albicans* и рубцы на клетках от почкования

При попадании в благоприятную среду он распадается, давая начало новым поколениям клеток. Основным способом размножения дрожжей – почкование. Старые клетки можно отличить от молодых по количеству рубцов на клетках от почкования (рис. 10).

**3. Простейшие.** *Protozoa* представляют собой одноклеточные гетеротрофные эукариотические организмы (рис. 11, а). Особенности простейших являются: отсутствие дифференцированных тканей у колониальных форм, способность большинства представителей к фаготрофному типу питания, способность к движению, отсутствие ригидной клеточной стенки. Многие из них, являясь возбудителями тяжелых заболеваний человека и животных, ведут паразитический образ жизни. Средний размер клеток простейших 50–150 мкм, но встречаются и более мелкие и более крупные формы. Многие простейшие на определенной стадии жизненного цикла формируют покоящиеся формы – цисты, которые характеризуются очень низкой метаболической активностью. Цисты содержат клеточную стенку, которой нет у вегетативных форм. В форме цист простейшие переживают неблагоприятные условия среды: голодание, высушивание, отсутствие  $O_2$ , изменения pH и др.

В настоящее время не существует единой системы классификации простейших, что объясняется слишком большим количеством различий в их строении, морфологии, особенностях физиологии.

Известно около 7500 видов инфузорий, которые обитают в пресноводных и морских водоемах, а также в почве. Это одни из самых крупных свободноживущих простейших: размеры некоторых особей могут достигать 2 мм в длину.

Инфузории высокоустойчивы к различного рода загрязнениям, благодаря чему находят применение в очистке сточных вод и являются обязательным компонентом активного ила аэротенков. Наиболее распространены и изучены следующие роды: *Paramecium*, *Tetrahymena*, *Vorticella*, *Stentor*, *Didinium*.

Инфузории рода *Paramecium* широко используются в токсикологической практике. Такая живая модель позволяет определить дозозависимые эффекты различных фармакологических препаратов, косметических средств, кормовых и пищевых продуктов. Результаты биотестирования на *Paramecium* хорошо коррелируют с результатами, полученными в опытах *in vivo* на теплокровных животных.



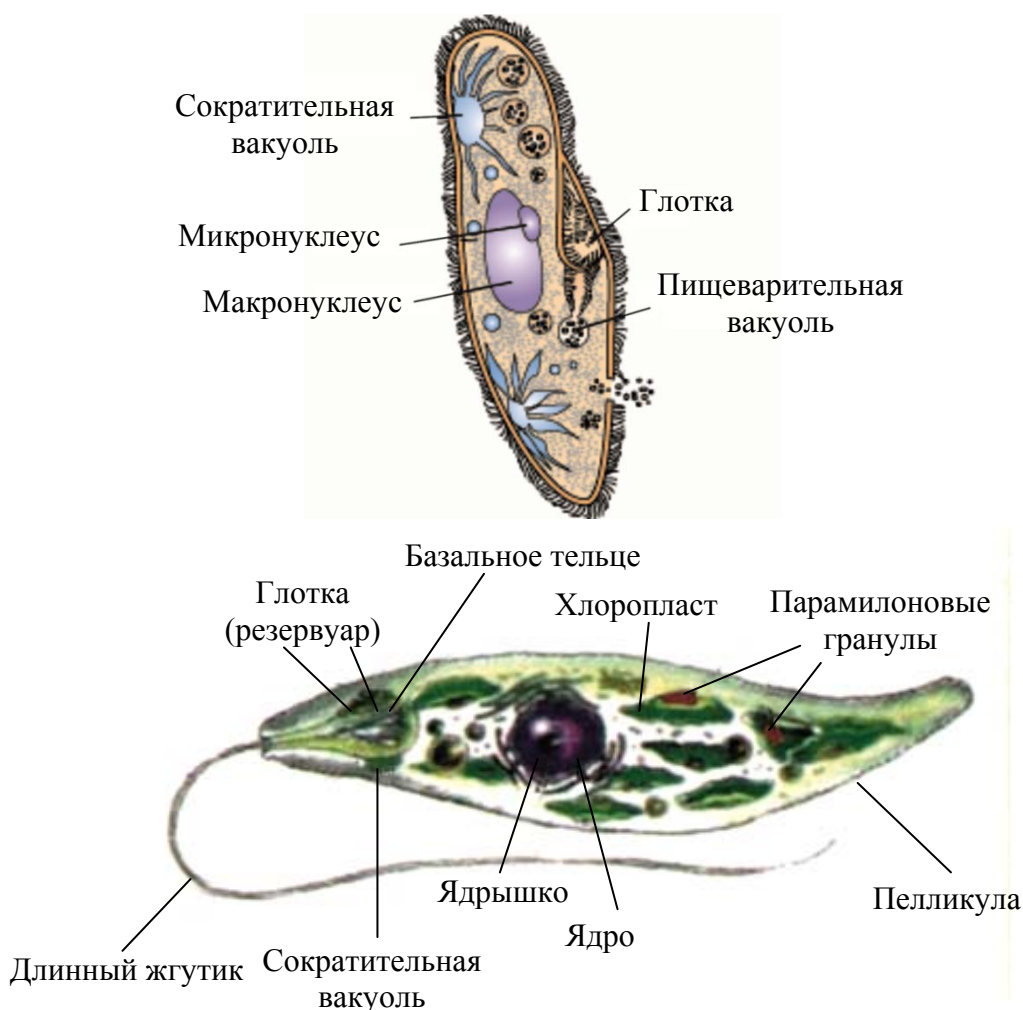


Рис. 11. Строение инфузории *Paramecium caudatum* (а) и микроводоросли *Euglena gracilis* (б)

**4. Микроводоросли.** Водоросли (*Algae*) представляют собой фотосинтезирующие эукариотические организмы, не обладающие дифференцированными тканями, в отличие от других фотосинтезирующих эукариот – зеленых растений. Среди них встречаются одноклеточные и многоклеточные представители. Большинство водорослей способно к автотрофному питанию на свету, поскольку используют энергию световых реакций. Есть, однако, представители с дефектным фотосинтезирующим аппаратом, не способные фиксировать  $\text{CO}_2$ . В темноте водоросли переключаются на гетеротрофное питание, получая энергию в ходе дыхания.

В основу разграничения водорослей по основным таксонам (царствам, отделам, классам и др.) положены следующие признаки: тип фотосинтетических пигментов и окраска клеток; наличие



жгутиков, их строение, количество и способ прикрепления к клетке; химический состав клеточной стенки и дополнительных оболочек; виды запасных веществ; число клеток и их взаимодействие.

Ранее водоросли классифицировали в составе царства растений, где они составляли обособленную группу. Однако с развитием молекулярно-генетических методов систематики стало ясно, что эта группа филогенетически очень неоднородна. В настоящее время водоросли относят к двум царствам эукариот: *Chromista* и *Protista*.

Одной из разновидностей *Algae* являются эвгленовые водоросли (рис. 11, б). Это одноклеточные микроорганизмы, размером 4–500 мкм, содержащие 1–3 жгутика. Клетки могут менять форму от круглой до веретенообразной, поскольку они не имеют ригидной клеточной стенки. Размножаются эвгленовые водоросли делением.

Клетки эвглен сложно организованы: имеют множество мелких хлоропластов, сократительную вакуоль, стигму, парамилоновые гранулы, ядро с ядрышком, остальные присущие эукариотам органеллы, длинный и короткий жгутики, глотку (рис. 11, б). Сократительная вакуоль собирает избыток воды из всех частей клетки и выбрасывает ее в глотку (выделительный орган). Стигма обеспечивает эвгленам способность к фототаксису. Эвгленовым водорослям свойственно автотрофное и гетеротрофное питание. В последнем случае питательные вещества поступают в клетку в растворенном виде, всасываясь всей ее поверхностью. В темноте они могут утрачивать хлоропласты и неограниченно долго демонстрировать гетеротрофный тип питания, не отличаясь в этом случае от простейших.

Практическое значение эвгленовых водорослей, которых насчитывается до 900 видов, определяется их способностью к миксотрофному питанию, что позволяет им участвовать в самоочищении водоемов, загрязненных органикой. Наличие большого количества эвглен в водоеме служит индикатором его загрязненности, а неприхотливость и легкость культивирования этих водорослей позволяет использовать их для биоиндикации и биотестирования токсикантов в различных средах, включая и пищевые продукты.

### Задание

1. Изучить устройство светового микроскопа и основные правила работы с ним.
2. Овладеть методами и техникой приготовления препаратов грибов, дрожжей, бактерий для световой микроскопии.

3. Освоить простые и сложные методы окраски микроорганизмов и изучить под микроскопом морфологические свойства бактерий, дрожжей, простейших.

4. Приготовить фиксированные окрашенные препараты бактерий и дрожжей и рассмотреть их под микроскопом.

5. Приготовить фиксированные мазки бактерий: Гр (+), Гр (–) и неизвестную культуру. Провести окраску микроорганизмов по Граму. Определить, к какому типу относится неизвестный микроорганизм.

6. Наблюдать споры у микроорганизмов рода *Bacillus*, *Clostridium*, окрасив их по Шефферу – Фултону.

7. Обнаружить капсулы у микроорганизмов рода *Leuconostoc*, окрасив их по методу Гинса – Бурри.

**Материалы и оборудование.** Световой биологический микроскоп и принадлежности к нему, фотонасадка, цифровой фотоаппарат, предметные и покровные стекла, препараты чистых культур бактерий, дрожжей, мицелиальных грибов, микроводорослей, простейших, микробиологические петли, пинцеты, стеклянные палочки, спиртовки, предметные и покровные стекла, предметные стекла с лунками, фильтровальная бумага, наборы красителей, ванночки и рейки для окрашивания образцов.

### Вопросы для самопроверки

1. Из каких основных частей состоит световой микроскоп и в чем их назначение?

2. Как выполнить настройку освещения микроскопа по Келлеру и для чего она необходима?

3. Какие количественные показатели используются для характеристики светового микроскопа и как их определить?

4. От чего зависит разрешающая способность микроскопа и как влияет глубина резкости на изображение микроорганизмов?

5. Какие правила существуют для работы со световым микроскопом?

6. Какие объективы следует выбирать при наблюдении препаратов бактерий, грибов, дрожжей?

7. Как работает иммерсионная система микроскопа?

8. Для чего применяется биологическое окрашивание микроорганизмов и какие способы окрашивания существуют?

9. Как устроена клеточная стенка бактерий и в чем сущность метода окраски клеточных стенок бактерий по Граму?

10. Как определить наличие спор в бактериях по Шефферу – Фултону?
11. Какую роль играет капсула бактерий и как ее можно обнаружить по методу Гинса – Бурри?
12. Как определить жизнеспособность клеток с помощью витальных красителей?
13. Дайте характеристику морфологических свойств бактерий и их основных органелл.
14. В чем различие морфологических свойств бактерий и грибов?
15. Охарактеризуйте морфологические свойства микромицетов.
16. Сравните строение про- и эукариотических клеток.
17. Чем отличаются клетки растительных и животных организмов?
18. Перечислите основные морфологические свойства простейших и микроводорослей.

### Литература

1. Белясова, Н. А. Микробиология. Лабораторный практикум / Н. А. Белясова. – Минск: БГТУ, 2007. – 160 с.
2. Пантелеев, В. Компьютерная микроскопия / В. Пантелеев, О. Егорова, Е. Климова. – М.: Техносфера, 2005. – 302 с.
3. Брэдбери, С. Дж. Световая микроскопия в биологии: методы / С. Дж. Брэдбери; пер. с англ. – М.: Иностран. лит., 1992. – 462 с.
4. Квасников, Е. И. Дрожжи. Биология. Пути использования / Е. И. Квасников, И. Ф. Щелокова. – Киев: Навук. думка, 1991. – 328 с.
5. Жарикова, Г. Г. Микробиология продовольственных товаров. Санитария и гигиена: учебник / Г. Г. Жарикова. – 3-е изд. – М.: Издат. центр «Академия», 2008. – 300 с.
6. Блекберн, К. де В. Микробиологическая порча пищевых продуктов / К. де В. Блекберн; пер. с англ.; под общ. ред. Д. К. Раппорт. – СПб.: Профессия, 2008. – 784 с.
7. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / М. Н. Пименова [и др.]; под общ. ред. М. Н. Пименовой. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: МГУ, 1995. – 224 с.
8. Абламейко, С. В. Обработка оптических изображений клеточных структур в медицине / С. В. Абламейко, А. М. Недзьведь. – Минск: ОИПИ НАН Беларуси, 2005. – 156 с.
9. Полонская, Н. Ю. Основы цитологической диагностики и микроскопической техники: учеб. пособие для студентов вузов / Н. Ю. Полонская, О. В. Егорова. – М.: Академия, 2005. – 160 с.

10. Лабинская, А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. – М.: Медицина, 1978. – 392 с.
11. Современная микробиология: в 2 т. / ред. Й. Ленгелер, Г. Дреус, Г. Шлегель. – М.: Мир, 2005. – Т. 1. – 654 с.
12. Гусев, М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. – М.: Академия, 2007. – 462 с.
13. Методы общей бактериологии: в 3 т. / под ред. Ф. Герхардта [и др.]. – М.: Мир, 1983–1984. – Т. 1. – 536 с.; Т. 2. – 472 с.; Т. 3. – 264 с.
14. Стейниер, Р. Мир микробов: в 3 т. / Р. Стейниер, Э. Эдельберг, Дж. Ингрэм. – М.: Мир, 1979. – Т. 1 – 320 с.; Т. 2. – 334 с.; Т. 3. – 486 с.
15. Шлегель, Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. – М.: Мир, 1987. – 567 с.
16. Игнатенко, А. В. Микробиологические, органолептические и визуальные методы контроля качества пищевых товаров. Микрокалориметрия. Лабораторный практикум / А. В. Игнатенко, Н. В. Гриц. – Минск: БГТУ, 2003. – 114 с.
17. Игнатенко А. В. Сенсорный контроль качества пищевых продуктов. Лабораторный практикум: учеб. пособие / А. В. Игнатенко. – Минск: БГТУ, 2008. – 186 с.
18. Дерябин, Д. Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты / Д. Г. Дерябин. – М.: Наука, 2009. – 248 с.
19. Луста, К. А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов / К. А. Луста, Б. А., Фихте. – Пущино: ОНТИ НЦБИ, 1990. – 186 с.

### **3.4. Количественный микробиологический анализ**

#### **Лабораторная работа № 2**

#### **МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ И КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО КОЛИЧЕСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ**

*Цель работы* – приобретение навыков количественного микробиологического анализа, оценки содержания клеток методом световой микроскопии и методом посева и культивирования микроорганизмов в питательных средах.

## Микроскопические методы количественного анализа микроорганизмов

Световая микроскопия позволяет количественно оценивать размеры, содержание микроорганизмов, долю жизнеспособных клеток, их подвижность, а также может быть использована для оценки бактериальной свежести отдельных пищевых продуктов.

### 1. Оценка размеров клеток методом световой микроскопии

При определении размеров микроорганизмов следует избегать деформации клеток в ходе приготовления препарата.

Обычно при термической фиксации, а также при окрашивании клеток происходит уменьшение истинных размеров клеток в результате их сжатия. Поэтому предпочтительнее определять размеры живых клеток. В случае подвижных клеток к капле исследуемой суспензии добавляют 0,1%-ный агар-агар.

Размер микроорганизмов определяют с помощью окуляр-микрометра и объект-микрометра.

*Окуляр-микрометр* представляет собой круглую стеклянную пластинку, в центре которой нанесены деления. Пластинку вставляют в окуляр: для этого вывинчивают глазную линзу окуляра, помещают на него диафрагму окуляр-микрометра делениями вниз и завинчивают линзу. Чтобы с помощью окуляр-микрометра рассчитать размер клетки, следует предварительно определить цену деления на его шкале. Для этого и используют объект-микрометр.

*Объект-микрометр* – это металлическая пластинка с отверстием в центре, в которое вставлено стекло с нанесенной на него линейкой длиной 1 мм. Цена одного деления линейки объект-микрометра составляет 10 мкм.

Для определения цены деления окуляр-микрометра поступают следующим образом:

– помещают объект-микрометр на столик микроскопа, фокусируют при малом увеличении, а затем переводят револьвер на тот объектив, с помощью которого будет определяться величина клеток. Фокусируют деления линейки объект-микрометра;

– поворачивают окуляр-микрометр таким образом, чтобы его шкала была параллельна шкале объект-микрометра;

– определяют цену деления окуляр-микрометра с помощью шкалы объект-микрометра по количеству совпавших делений окуляр-микрометра и объект-микрометра по формуле

$$Ц_1 = n_2 \cdot Ц_2 / n_1, \quad (11)$$

где  $Ц_1$ ,  $Ц_2$  – цена деления окуляр-микрометра и объект-микрометра соответственно;  $n_2$ ,  $n_1$  – число совпавших делений объект-микрометра и окуляр-микрометра;

– не меняя настроек, помещают на столике вместо объект-микрометра препарат, выбирают отдельные клетки, совмещают край сетки окуляр-микрометра с краем культуры клеток и определяют размеры клеток, пользуясь шкалой окуляр-микрометра.

Для получения достоверных результатов необходимо измерить не менее 20–30 клеток.

Абсолютная погрешность измерения размеров методом световой микроскопии составляет  $\pm 0,2$  мкм.

## **2. Определение общего количества микроорганизмов в счетных камерах**

Для количественного учета микроорганизмов используют счетные камеры разных конструкций (Горяева, Фукс – Розенталя, Петрова – Хауссера, Тома – Цейса и др.). Счетные камеры могут быть использованы лишь для подсчета относительно крупных объектов – клеток водорослей, дрожжей, спор грибов, микроскопируемых при объективе от  $8\times$  до  $40\times$ . При этом в счетных камерах проводится учет всех клеток микроорганизмов без их дифференциации на живые и мертвые.

В качестве примера счетной камеры можно привести камеру Горяева, которая представляет собой толстое предметное стекло, разделенное поперечными бороздками, образующими три поперечно расположенные плоские площадки (рис. 12). Средняя площадка продольным прорезом разделена пополам, причем на каждой половине нанесена квадратная сетка. Две боковые площадки расположены на 0,1 мм выше средней, они служат для притирания покровного стекла. Сетка разделена на определенное число больших и маленьких квадратов, по-разному сгруппированных. Камера Горяева имеет площадь  $9 \text{ мм}^2$ , объем камеры  $9 \text{ мм}^3$  и разбита на 225 больших квадратов (15 рядов по 15 больших квадратов в каждом ряду).

Постоянной величиной во всех сетках является маленький квадрат (рис. 12, *a*), сторона которого равна  $1/20$  мм, площадь его –  $1/400$  мм<sup>2</sup>, а объем при высоте камеры  $1/10$  мм –  $1/4000$  мм<sup>3</sup>, или  $1/4\ 000\ 000$  мл. Большой квадрат состоит из 16 малых квадратов) [14].

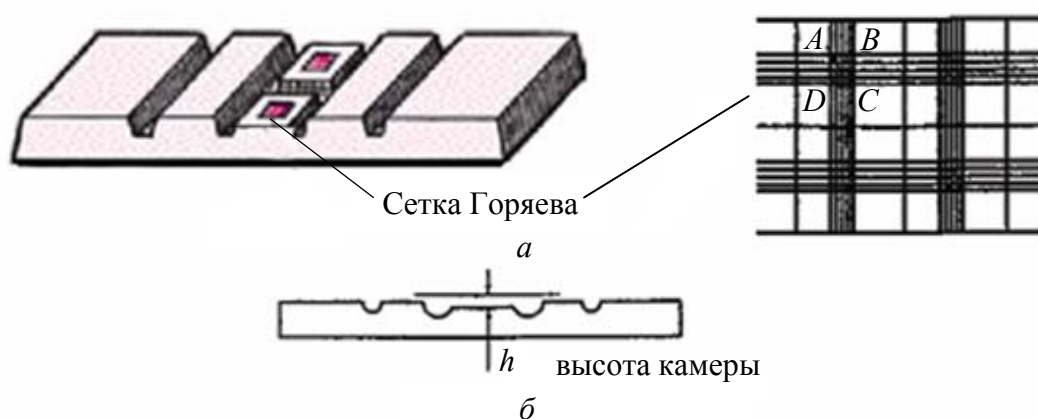


Рис. 12. Счетная камера Горяева:  
*a* – общий вид камеры и сетки при малом увеличении; *б* – вид камеры сбоку

### *Ход работы*

1. Каплю взвеси микроорганизмов наносят капилляром или пипеткой на сетку камеры и сверху накрывают чистым покровным стеклом. Жидкость под покровным стеклом должна равномерно без пузырьков распределиться по всей сетке, не выступая в желобок между стенками. Большими пальцами покровное стекло плотно притирают к боковым площадкам камеры до появления картины интерференции (колец Ньютона).

2. Заполненную камеру помещают на предметный столик микроскопа и через 2 мин микроскопируют с объективом от  $\times 8$  до  $\times 40$  (в поле зрения должны быть отчетливо видны как квадратики, так и клетки микроорганизмов). Подвижные клетки перед заполнением камеры убивают нагреванием или 0,5%-ным раствором формалина.

3. Подсчитывают количество клеток в пяти больших квадратах (80 малых), расположенных по диагонали. Учитывают все клетки, размещенные внутри квадрата и на пограничных линиях, если они большей частью лежат внутри квадрата. Клетки, разделенные пограничной линией пополам, считают только на двух из четырех границ квадрата, а клетки, лежащие большей своей половиной вне данного квадрата, совсем не учитывают.

4. Рассчитывают количество клеток в 1 мл исследуемой суспензии по формуле

$$M = a \cdot 10^3 \cdot n / h \cdot S, \quad (12)$$

где  $M$  – количество клеток в 1 мл суспензии;  $a$  – среднее количество клеток в квадрате сетки;  $h$  – высота камеры, мм;  $S$  – площадь квадрата сетки, мм<sup>2</sup>;  $10^3$  – коэффициент перевода (сантиметры кубические в миллиметры кубические);  $n$  – коэффициент разведения исследуемой суспензии [15].

Минимальное количество клеток, определяемое методом подсчета в камере Горяева, составляет  $(0,5-1,0) \cdot 10^5$  кл/см<sup>3</sup>.

### **3. Определение общего количества бактерий методом Виноградского – Брида**

Подсчет клеток на фиксированных окрашенных мазках (метод Виноградского – Брида) применяется в различных модификациях для определения численности микроорганизмов в разнообразных естественных субстратах – почве, загрязненной воде, пищевых продуктах и других оптически непрозрачных средах.

Преимущество метода перед счетными камерами заключается в том, что метод позволяет анализировать крупные и мелкие микроорганизмы с иммерсионной системой. Кроме того, фиксированные окрашенные препараты могут долго храниться, поэтому подсчет можно производить в удобное для исследователя время.

#### ***Ход работы***

1. Хорошо обезжиренное предметное стекло помещают на миллиметровую бумагу, на которой размечен прямоугольник площадью 4 или 6 см<sup>2</sup>.

2. Наносят на стекло точно отмеренный объем исследуемой суспензии (10–30 мкл) и равномерно распределяют ее петлей по всей отмеченной площади.

3. Препарат подсушивают на воздухе, фиксируют в пламени спиртовки и окрашивают метиленовым синим или фуксином, промывают водой и высушивают на воздухе. В таком виде препараты хорошо сохраняются.

4. Микроскопируют препараты с иммерсионным объективом и подсчитывают количество клеток с помощью квадратов окулярной сетки или в поле зрения микроскопа. Правила подсчета в квадратах окулярной сетки то же, что и в квадратах сетки счетной



камеры. Чтобы результат был достоверным, клетки микроорганизмов рекомендуется подсчитывать в 50–100 полях зрения. Общее количество подсчитанных клеток не должно быть менее 600.

5. Количество клеток микроорганизмов в исследуемом препарате вычисляют по формуле

$$M = a \cdot S \cdot n / s \cdot V, \quad (13)$$

где  $M$  – количество клеток в  $1 \text{ см}^3$  препарата исследуемого субстрата;  $a$  – среднее количество клеток в квадрате окулярной сетки (поле зрения);  $s$  – площадь квадрата окулярной сетки (поля зрения),  $\text{мм}^2$ ;  $S$  – площадь мазка,  $\text{мм}^2$ ;  $V$  – объем нанесенной на стекло суспензии,  $\text{см}^3$ ;  $n$  – коэффициент разведения исследуемой суспензии.

Площадь квадрата сетки (или поля зрения, определяют с помощью объект-микрометра, который помещают на столик микроскопа вместо препарата, и при том же увеличении, при котором проводили подсчет, определяют сторону квадрата окулярной сетки (или диаметр поля зрения –  $D$ ). Площадь поля зрения вычисляют по формуле  $s = \pi D^2 / 4$ . При площади поля зрения –  $0,0001 \text{ см}^2$ , площади мазка –  $4 \text{ см}^2$ , объеме нанесенной суспензии –  $0,01 \text{ см}^3$  и  $a = 1$  –  $M = 4 \cdot 10^6 \text{ кл/см}^3$ .

## Методы посева и культивирования микроорганизмов

### 1. Общая характеристика питательных сред для культивирования микроорганизмов

Выделение микроорганизмов из внешней среды и пищевых продуктов, изучение их свойств, количественный учет и идентификация, поддержание культур в жизнеспособном состоянии требуют использования разнообразных питательных сред для выращивания микроорганизмов.

Питательные среды являются основой микробиологической работы, и их качество нередко определяет результаты всего исследования. Они должны удовлетворять ряду требований:

- содержать достаточные количества воды, биогенных, макро- и микроэлементов, факторов роста для жизнедеятельности микроорганизмов с учетом типа их питания;
- обладать определенными физико-химическими свойствами, оптимальными для развития микроорганизмов: рН, Eh, активность воды, ионная сила, буферная емкость;

- быть стерильными;
  - быть прозрачными, для удобства наблюдения колоний клеток.
- В микробиологии используют следующие виды сред:

– **натуральные (полноценные) питательные среды.** Готовят их из продуктов животного или растительного происхождения (молока, крови, отваров мяса и др.). Эти среды имеют неопределенный состав, но содержат все необходимые микроорганизмам компоненты. Примерами натуральных сред являются: мясопептонный бульон (МПБ), питательный бульон (ПБ) используют для культивирования широкого круга бактерий; солодовое сусло – среда пригодна для выращивания мицелиальных грибов и дрожжей; картофельный отвар – применяют для культивирования фитопатогенных микроорганизмов.

Натуральные среды чаще всего используют для наращивания биомассы, поскольку культуры на этих средах быстрее растут. Кроме того, применяются для хранения микроорганизмов и культивирования тех из них, чьи питательные потребности не выявлены;

– **синтетические (минимальные, бедные) среды:** имеют определенный, но не полноценный химический состав. Они готовятся из чистых веществ – источников нужных микроорганизмам химических элементов и содержат эти вещества в строго определенных количествах. Такие среды пригодны для культивирования микроорганизмов, чьи питательные потребности четко определены;

– **полусинтетические среды:** готовят на основе синтетических, но в качестве источников факторов роста добавляют небольшие количества натуральных продуктов или дрожжевой экстракт как источник факторов роста.

– **«живые» среды:** используют для культивирования микроорганизмов, способных размножаться только в живых клетках. Например, для культивирования бактериофагов «живой» питательной средой будет служить культура чувствительных бактерий;

– **жидкие среды:** ПБ, сусло бульон (СБ) и другие – не содержат уплотнителей и чаще всего используют для накопления биомассы микроорганизмов;

– **плотные (твердые) среды:** отличаются от жидких сред наличием уплотнителя (агар-агар, казеин, силикагель). Наиболее часто используется агар-агар, который представляет собой сложный полисахарид, извлеченный из красных водорослей. Существенными преимуществами агара перед другими уплотнителями являются: широкий диапазон температур для культивирования

микроорганизмов, включая выращивание крайне термофильных представителей. Температура плавления для 2%-ного геля – 98°C, затвердевания – 42°C.

Агар-агар не утилизируется в качестве источника углерода и энергии большинством микроорганизмов, а значит, не разжижается при их культивировании. Он выдерживает многократные циклы разогрева-застывания без потери своих свойств.

Не все клетки способны расти на плотных средах: на них формируют колонии бактерии, дрожжи, грибы.

Водоросли и простейшие культивируются только в жидких средах;

– **полужидкие среды**: готовятся на основе жидких с добавлением меньшего количества уплотнителей, поэтому имеют «мягкую» консистенцию. Агар-агар вносят в полужидкие среды в концентрации 0,5–0,8%, желатин – 7–10%. Эти среды используют для работы с бактериофагами, для хранения культур, в тестах на разжижение желатина, в методах определения диффузии веществ в среду и др.;

– **накопительные среды**: используют для накопления биомассы определенных видов микроорганизмов. Чаще это жидкие среды, иногда – плотные. В большинстве случаев – натуральные;

– **элективные среды**: служат для выделения микроорганизмов с определенными свойствами из природных источников. Их особенностью является такой состав, который способствует развитию нужной группы микроорганизмов и ограничивает развитие остальных. Чаще всего это жидкие синтетические или полусинтетические среды с единственным источником углерода и энергии;

– **дифференциально-диагностические (индикаторные) среды**: среды данной категории содержат один или несколько индикаторов и используют при идентификации микроорганизмов по изменению окраски колоний или самой среды в результате изменения их pH или Eh;

– **селективные среды**: служат для отбора потомства микроорганизмов после событий генетического обмена. Эти среды составляются таким образом, чтобы обеспечить рост только определенных микроорганизмов (отбираемых, или селективируемых) и предотвратить рост родительских форм. Это, как правило, синтетические среды, содержащие антибиотики и лишённые определенных факторов роста.

## 2. Приготовление питательных сред для культивирования микроорганизмов

### *Ход работы*

1. Каждая пара студентов готовит несколько питательных сред по заданию руководителя, а все вместе приготавливают весь набор питательных сред, которые будут необходимы в течение всего лабораторного практикума.

2. Вначале собирают посуду и реагенты для приготовления питательных сред.

3. Рассчитывают навески реагентов для приготовления питательных сред в соответствии с прописями, приведенными в приложении 2. Расчет необходимой навески проводят с соблюдением общего правила: объем питательной среды для автоклавирования не должен превышать 2/3 объема используемой посуды, иначе питательные среды будут выливаться при автоклавировании.

4. После взвешивания навеску вносят в приготовленную емкость, частично заполненную водой, и растворяют ее при перемешивании. Для улучшения растворения раствор подогревают в СВЧ-печи. Добавляют воду в суспензию до необходимого объема.

5. Для получения прозрачных сред их фильтруют через бумажный фильтр. Агаризованные среды фильтруют при необходимости в горячем состоянии через ватный фильтр.

6. После растворения компонентов питательных сред проверяют их pH на pH-метре и при необходимости доводят 0,1 н растворами кислоты или щелочи до необходимого значения. В ряде случаев контролируют Eh среды, используя Pt, AgCl электроды и pH-метр.

7. Подписывают на клейкой бумаге, устойчивой к нагреванию, наименование сред, дату их приготовления, номер группы и наклеивают ее на сосуд с приготовленной средой.

8. Приготовленные среды относят на автоклавирование и параллельно изучают устройство автоклава и принцип его работы.

9. Далее готовят посуду для стерилизации. Для этого ее моют, сушат и закрывают в бумагу (пипетки, бумажные фильтры), закрывают ватными пробками (колбы), алюминиевыми колпачками (пробирки) для сохранения стерильности после обработки. Указывают на футлярах для пипеток: емкость, направление их размещения.

10. Помещают посуду в сушильный шкаф и стерилизуют в течение 2 ч при 180°C.

11. По окончании стерилизации охлаждают сушильный шкаф, вынимают стерильную посуду и хранят ее в отведенном месте для каждой группы.

### **3. Методы посева и культивирования микроорганизмов**

В микробиологической практике используют следующие методы посева и культивирования микроорганизмов:

- посев в жидкие среды и качалочные колбы;
- посев в агар уколом;
- посев на скошенный агар;
- метод исчерпывающего штриха;
- метод предварительных разведений.
- посев на поверхности агара шпателем;
- глубинный посев в агар.

Во всех случаях работы с микроорганизмами данными методами используют стерильные инструменты, посуду, закрытую алюминиевыми колпачками или ватными тампонами, и соблюдают правила стерильной работы при отборе, посеве и культивировании микроорганизмов. В противном случае это приведет к неправильным результатам и порче питательных сред.

Применение методов посева и культивирования микроорганизмов может осуществляться для достижения следующих целей:

- 1) накопления биомассы;
- 2) обогащения смешанной культуры микроорганизмами определенной группы;
- 3) получения чистой культуры клеток;
- 4) выделения целевого продукта;
- 5) перевода клеток в нужную фазу роста;
- 6) изучения биохимических, физиологических, культуральных свойств клеток и их идентификации;
- 7) количественного подсчета клеток;
- 8) изучения взаимоотношения микроорганизмов;
- 9) хранения микроорганизмов.

#### *Ход работы*

##### ***А. Посев микроорганизмов в жидкие среды***

1. В две стерильные пробирки наливают 3–5 см<sup>3</sup> ПБ, СБ.

2. Стерильной бактериальной петлей последовательно отбирают колонии бактерий, дрожжей с чашек Петри, вносят их в питательные среды.

3. Засеянные пробирки помещают в термостат на 30°C и культивируют 1–3 сут. О росте микроорганизмов судят по помутнению питательной среды и появлению типичного запаха.

4. Посев дрожжей в качалочную колбу ( $V = 250 \text{ см}^3$ ) проводят в стерильных условиях путем внесения в нее 100 см<sup>3</sup> СБ и добавления жидкой культуры дрожжей, полученной выше. Колбу помещают на шейкер и культивируют при комнатной температуре и непрерывном перемешивании в течение нескольких суток.

#### ***Б. Посев микроорганизмов в питательный агар уколом***

1. Расплавляют МПА среду в СВЧ-печи.

2. Вливают в стерильную пробирку 5–7 см<sup>3</sup> агаризованной среды и дожидаются ее застывания.

3. Отбирают стерильной микробиологической иглой колонию бактерий из чашки Петри.

4. Проводят вертикальный прокол среды иглой с микроорганизмами и помещают пробирку на сутки в термостат на 30°C.

5. Наблюдают через сутки характер роста микроорганизмов по уколу. При росте микроорганизмов вблизи поверхности они относятся к аэробам, в глубине среды – к анаэробам; по всему уколу – к факультативным аэробам. По наличию трещин вдоль укола судят о способности микроорганизмов к газообразованию.

#### ***В. Посев микроорганизмов на скошенный агар***

1. Расплавляют ПА среду в СВЧ-печи.

2. Вливают в стерильную пробирку на 1/5 ее высоты расплавленную агаризованную среду, помещают ее в наклонный штатив с углом наклона 15° и оставляют на 10–15 мин для застывания и получения скошенного агара.

3. Для засева бактерий на скошенный агар отбирают стерильной охлажденной петлей колонию микроорганизмов, вносят петлю вниз скошенного агара и волнообразными движениями засевают поверхность питательного агара.

4. Пробирку помещают в термостат на 30°C на 1–3 сут и наблюдают образование газона микроорганизмов на поверхности агара.

Метод посева микроорганизмов на скошенный агар используют для получения и хранения чистых культур микроорганизмов.

### ***Г. Посев исчерпывающим штрихом***

1. Расплавляют ПА в СВЧ-печи, вливают в нижнюю чашку Петри до ее половины и, покачивая, распределяют по поверхности чашки.

2. Прикрывают чашку стерильной фильтровальной бумагой, прижимают ее верхней крышкой и оставляют на 10–15 мин для застывания агара.

3. Отбирают бактериальной петлей колонию микроорганизмов и проводят три-четыре параллельных штриха по поверхности агара в чашке.

4. Обжигают петлю в пламени спиртовки, поворачивают чашку на  $90^{\circ}$ – $120^{\circ}$  и охлажденной петлей проводят три-четыре штриха из конечной части предыдущих штрихов. Аналогичную процедуру повторяют еще несколько раз.

5. Чашки помещают в термостат на  $30^{\circ}\text{C}$  на сутки и регистрируют образование отдельных колоний (рис. 13).

Данный метод используют для механического разобщения клеток и получения чистых культур бактерий и дрожжей.



Рис. 13. Посев и культивирование микроорганизмов методом исчерпывающего штриха

### ***Д. Метод предварительных разведений микроорганизмов***

1. Для получения последовательных десятикратных разведений отбирают 3–4 стерильные пробирки, вставляют в штатив и вливают в них по  $4,5\text{ см}^3$  физиологического раствора (ФР).

2. Вносят в скошенную культуру клеток микроорганизмов 2–3  $\text{см}^3$  физиологического раствора, взбалтывают и переливают суспензию микроорганизмов в новую пробирку.

3. Отбирают из пробирки пипеткой на  $1\text{ см}^3$   $0,5\text{ см}^3$  культуры клеток и переносят в первую пробирку, после чего ее отставляют на одну ячейку в сторону, чтобы не перепутать.

4. Новой стерильной пипеткой отбирают из отставленной в сторону пробирки  $0,5\text{ см}^3$  суспензии клеток и переносят в следующую пробирку. Повторяют аналогичную процедуру несколько раз, пока не будет засеяна последняя пробирка (рис. 14).

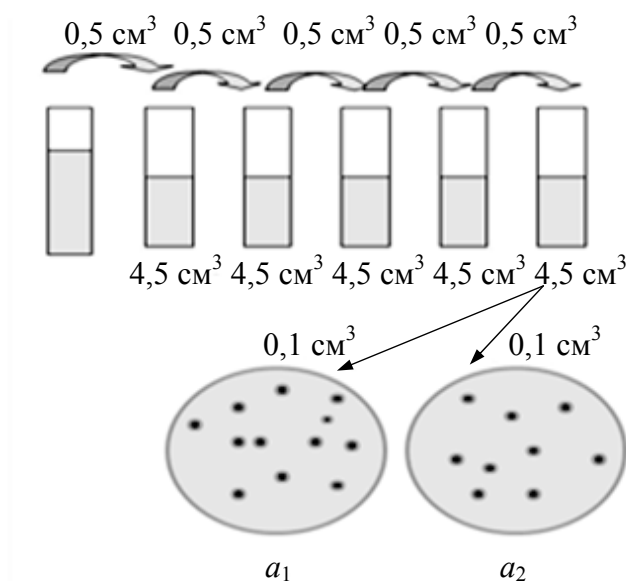


Рис. 14. Приготовление разведений, посев и подсчет колоний микроорганизмов на ПА

Предварительное разведение сред проводят для поверхностного или глубинного посева микроорганизмов на агаризованных средах, когда содержание микроорганизмов превышает  $3 \cdot 10^2$  кл/см<sup>3</sup>.

#### ***Е. Метод посева на поверхность агара шпателем***

1. Приготавливают суспензию микроорганизмов с примерно известным по порядку содержанием клеток.

2. Готовят предварительные разведения микроорганизмов, как описано в п. Д. Количество пробирок для приготовления разведений подбирают таким образом, чтобы на чашках после приготовления последнего разведения и культивирования микроорганизмов выросло не более 300 колоний для бактерий, 150 колоний – для дрожжей, 50 колоний для плесеней.

3. Заливают в 2 чашки Петри расплавленную агаризованную среду и приготавливают к засеву, как описано в п. Г.

4. С последнего разведения отбирают 0,1 см<sup>3</sup> суспензии клеток и вносят на центр приготовленной питательной среды.

5. Стерилизуют стеклянный шпатель, помещая его в чашку со спиртом и опаливая затем в пламени спиртовки. После этого шпатель охлаждают о внутреннюю сторону верхней крышки чашки Петри.

6. Засев культуры клеток по поверхности агара проводят шпателем в течение 20 с, совершая поступательные движения в одном направлении и вращая чашку пальцами противоположной руки.



Засев ведут вначале в центре чашки, затем последовательно увеличивают амплитуду движения шпателя по всей чашке.

7. После засева чашки ее закрывают, подписывают наименование посева, степень разведения, Ф. И. О. и в перевернутом виде помещают в термостат на 30°C (37°C – для энтеробактерий) на 3 сут.

8. Аналогичную процедуру повторяют со второй чашкой, используемой для статистической обработки результатов измерений.

9. Далее подсчитывают количество выросших колоний на каждой чашке и рассчитывают среднее количество колоний ( $a$ ):

$$a = \sum a_i / n, \quad i = 1, n. \quad (14)$$

После этого подсчитывают общее количество микроорганизмов в анализируемой среде ( $\hat{N}$ ) по формуле:

$$N = a \cdot 10^f / v, \quad (15)$$

где  $f$  – степень разведения исходной культуры клеток;  $v$  – объем пробы для посева, вносимый в чашку.

10. Для оценки качества измерений подсчитывают среднеквадратичную ошибку среднего (СКО) и рассчитывают относительную погрешность ( $\varepsilon$ ) измерений по формулам:

$$\text{СКО} = \sqrt{(\sum (a_i - a)^2 / n(n - 1))}; \quad (16)$$

$$\varepsilon = \text{СКО} / a \cdot 100(\%). \quad (17)$$

Качество микробиологического анализа считается удовлетворительным, если относительная погрешность ( $\varepsilon$ ) не превышает  $\pm 20\%$ .

Метод посева и культивирования микроорганизмов на поверхности агаризованной среды используется для выращивания и подсчета содержания аэробов (дрожжи, мицелиальные грибы, бактерии).

#### ***Ж. Метод глубинного посева микроорганизмов в агар***

1. Плавят питательный агар в СВЧ-печи.

2. Охлаждают его на водяной бане при температуре 50°C.

3. Готовят разведения исходной культуры клеток (п. Д.)

4. В две чашки Петри вносят по 1 см<sup>3</sup> последнего разведения и вливают агаризованную питательную среду, быстро перемешивают, накрывают бумажными фильтрами, прижимая их крышками чашек Петри и оставляют при комнатной температуре до застывания агара.

5. После этого снимают бумажные фильтры, закрывают чашки, подписывают наименование посева, степень разведения, Ф. И. О. исполнителей.

6. Чашки помещают в термостат при 30°C в перевернутом виде для устранения образования конденсата и вторичного роста клеток.

7. Чашки культивируют трое суток, подсчитывают общее количество клеток и рассчитывают качество измерений в соответствии с формулами, приведенными в п. Е.

#### **4. Получение чистых культур микроорганизмов и характеристика их культуральных свойств**

Чистой культурой принято считать популяцию микроорганизмов, представляющую собой потомство одной особи.

Существует несколько способов выделения чистых культур микроорганизмов: наиболее часто используется чашечный метод Коха, который заключается в механическом разобщении клеток на плотной среде. В результате этого каждая клетка формирует одну колонию, состоящую из генетически однородных особей – потомков:

– *посев истощающим итрихом*. Данный метод выбирают в тех случаях, когда существует уверенность, что требуемый организм находится в элективной культуре в достаточно высокой концентрации;

– *метод Шукевича*. Он применяется для получения чистой культуры протей и других микроорганизмов, обладающих «ползущим» ростом. Посев исследуемого материала производят в конденсационную воду у основания скошенного агара. Подвижные микробы способны подниматься вверх по скошенному агару, неподвижные формы остаются расти внизу на месте посева. Пересекая верхние края пробирки, можно получить чистую культуру микроорганизмов;

– *метод предельных разведений в жидкой среде*. Метод применяют для выделения чистых культур микроорганизмов, не формирующих колонии на плотной среде. Этот способ удается реализовать лишь в том случае, когда требуемый микроорганизм преобладает в смешанной популяции.

– *рассев шпателем на поверхность плотной среды в трех чашках Петри (метод Коха)*. Получение чистых культур проводят в следующей последовательности.

#### ***Ход работы***

1. На поверхность питательной среды в чашке № 1 наносят стерильной пипеткой каплю накопительной культуры и распределяют ее стерильным шпателем.

2. Этим же шпателем, не стерилизуя, засевают чашки № 2, 3.

3. Засеянные чашки помещают в термостат и инкубируют при оптимальной температуре 3 сут.

4. Изучают рост микроорганизмов. Обычно в чашке № 1 наблюдается сплошной рост микроорганизмов, в чашках № 2 и № 3 формируются изолированные колонии;

5. Изучают культуральные свойства микроорганизмов (характер роста на плотной среде, цвет, форма, размеры, структура и консистенция колоний, состав питательных сред, на которых размножаются микроорганизмы). Колонии просматривают под малым увеличением микроскопа непосредственно на чашках Петри, обращая внимание на размеры, цвет, форму и профиль колоний (рис. 15 *a, б*):

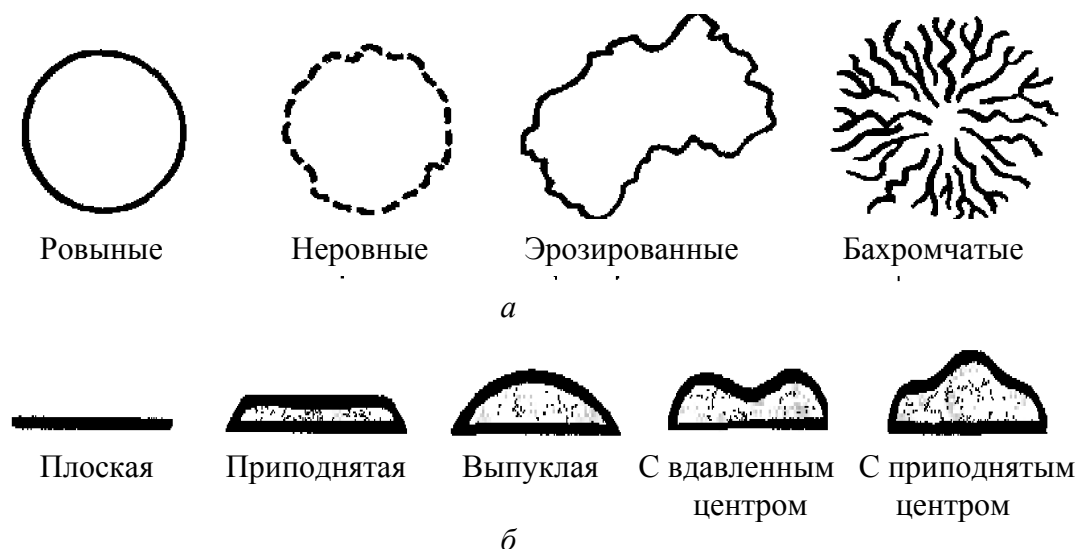


Рис. 15. Форма (*a*) и профиль (*б*) колоний микроорганизмов

### 5. Получение суточной культуры клеток

В процессе хранения часть микроорганизмов отмирает, в результате чего в популяции возрастает доля нежизнеспособных клеток. Перед проведением биохимических и физиологических испытаний чистых культур для увеличения доли жизнеспособных клеток в популяции из хранящейся чистой культуры микроорганизмов получают суточную (ночную) культуру. Она представляет собой суспензию клеток, культивируемых в жидкой питательной среде 16–18 ч. В ней достигается максимальная концентрация жизнеспособных клеток, обычно находящихся в стационарной фазе роста.

Суточные культуры используют для получения клеток в логарифмической фазе роста, увеличения клеточной биомассы, для изучения свойств клеток в жидких культурах и др.

#### *Ход работы*

1. Для получения суточной культуры в две стерильные пробирки вносят одной и той же стерильной пипеткой по 2 см<sup>3</sup> полноценной питательной среды. Пробирки маркируют. Затем в одну из них петлей засевают изолированную колонию микроорганизма.

2. Помещают посеvy в термостат и инкубируют 16–18 ч.

3. Перед использованием суточной культуры следует убедиться, что среда в контрольной пробирке осталась прозрачной и не имеет иных признаков роста микроорганизмов.

#### **6. Получение культур клеток в логарифмической фазе роста**

Для проведения экспериментов с микроорганизмами требуется получить клетки с максимальной физиологической и биохимической активностью. Чтобы обеспечить переход популяции в логарифмическую фазу роста, необходимо создать наиболее благоприятные условия культивирования для микроорганизмов.

#### *Ход работы*

1. Развести суточную культуру микроорганизмов в 10–100 раз свежей питательной средой.

2. Поместить разведения в термостат и культивировать при оптимальных условиях в течение 2–4 ч.

#### **Задание**

1. Провести оценку цены делений окулярной сетки с помощью объект-микрометра.

2. Определить количество дрожжевых клеток в приготовленной суспензии с помощью камеры Горяева.

3. Определить содержание бактерий в суспензии микроорганизмов методом Виноградского – Брида.

4. Приготовить питательные среды: физиологический раствор, ПБ, СБ, ПА, СА, Кесслера, Эндо, Плоскирева, Козера, Мюллера, Кита – Тароцци, ММ×9, Вильсона – Блера в соответствии с прописями, приведенными в приложении 2.

5. Посеять бактерии и дрожжи в жидкие питательные среды и получить суточные культуры клеток.

6. Посеять чистые культуры бактерий, дрожжей, грибов в питательный агар уколом, исчерпывающим штрихом, на скошенный агар.

7. Приготовить последовательные десятикратные разведения суточной культуры клеток.

9. Освоить метод поверхностного посева шпателем разведений микроорганизмов на ПА. Определить содержание микроорганизмов в исследуемой культуре и оценить качество измерений.

10. Освоить метод глубинного посева микроорганизмов в питательный агар. Определить концентрацию клеток в суточной культуре глубинным методом и оценить качество измерений.

11. Получить чистые культуры клеток методом Коха и изучить культуральные свойства микроорганизмов.

**Материалы и оборудование.** Световой биологический микроскоп и принадлежности к нему, чистые культуры бактерий, дрожжей, мицелиальных грибов, микроводорослей, микробиологические петли, пинцеты, стеклянные палочки, спиртовки, предметные и покровные стекла, наборы красителей, принадлежности для окрашивания образцов, объект-микромметр, окуляр-микромметр, питательные среды для культивирования микроорганизмов, химические реагенты для их приготовления, колбы, пипетки, пробирки, чашки Петри, сушильный шкаф, автоклав, СВЧ-печь, дистиллятор и дистиллированная вода, рН-метр, Eh-электроды.

### Вопросы для самопроверки

1. Какие количественные измерения можно выполнить с помощью светового микроскопа?

2. Как провести калибровку окулярной сетки с помощью объект-микромметра?

3. Опишите устройство счетной камеры Горяева. В каких случаях ее можно использовать для подсчета клеток?

4. Как определить содержание бактерий в среде с помощью метода Виноградского – Брида?

5. Как классифицируются питательные среды и для чего они используются?

6. Какие требования предъявляются к питательным средам для культивирования микроорганизмов?

7. Как приготовить питательную среду для культивирования микроорганизмов?
8. Какие существуют методы посева и культивирования микроорганизмов?
9. Для чего применяются методы посева в агар уколом?
10. Для чего используется метод посева микроорганизмов на скошенный агар?
11. Как посеять микроорганизмы в жидкие питательные среды?
12. Как получить чистые культуры клеток методом исчерпывающего штриха.
13. Чем отличаются методы последовательных и предельных разведений?
14. Как готовятся последовательные десятикратные разведения культур микроорганизмов?
15. Как определить содержание микроорганизмов в исследуемой среде методами поверхностного и глубинного посева и культивирования клеток?
16. Как оценить качество микробиологических измерений в методах посева и культивирования микроорганизмов?
17. Чем отличаются колонии различных микроорганизмов и с чем это может быть связано?

### Литература

1. Белясова, Н. А. Микробиология. Лабораторный практикум / Н. А. Белясова. – Минск: БГТУ, 2007. – 160 с.
2. Гусев, М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. – М.: Академия, 2007. – 462 с.
3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / М. Н. Пименова [и др.]; под общ. ред. М. Н. Пименовой. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: МГУ, 1995. – 224 с.
4. Методы общей бактериологии: в 3 т. / под ред. Ф. Герхардта [и др.]. – М.: Мир, 1983–1984. – Т. 1 – 536 с.; Т. 2. – 472 с.; Т. 3. – 264 с.
5. Стейниер, Р. Мир микробов: в 3 т. / Р. Стейниер, Э. Эдельберг, Дж. Ингрэм. – М.: Мир, 1979. – Т. 1 – 320 с.; Т. 2. – 334 с.; Т. 3. – 486 с.
6. Пантелеев, В. Компьютерная микроскопия / В. Пантелеев, О. Егорова, Е. Климова. – М.: Техносфера, 2005. – 302 с.
7. Современная микробиология: в 2 т. / ред. Й. Ленгелер, Г. Древис, Г. Шлегель. – М.: Мир, 2005. – Т. 1. – 654 с.

8. Луста, К. А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов / К. А. Луста, Б. А. Фихте. – Пушино: ОНТИ НЦБИ, 1990. – 186 с.

9. Лабинская, А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А. С. Лабинская. – М.: Медицина, 1978. – 392 с.

### **3.5. Микробиологический контроль качества и безопасности пищевой продукции**

**Качество пищевых продуктов** – совокупность свойств и характеристик продукции, удовлетворяющих потребителя и обеспечивающих безопасность его здоровья и жизнедеятельности.

Качество чистой продукции определяется ее пищевой, биологической и энергетической ценностью. О качестве загрязненной продукции можно судить по ее интегральным характеристикам: санитарно-микробиологическим, санитарно-химическим, органолептическим, которые отражают степень порчи пищевых продуктов.

Порчу пищевого продукта можно определить как «любое изменение продукта, делающее его неприемлемым для потребления человеком». Пищевые продукты портятся в результате протекания микробиологических, физических и биохимических процессов, а также вследствие жизнедеятельности паразитов.

Утрата продуктом желаемых свойств связана в основном с ростом микроорганизмов порчи и с продуцируемыми ими внеклеточными ферментами – протеазами, липазами и др. Самым важным требованием к пищевой продукции является требование безопасности.

**Безопасность продуктов питания** – аспект качества продукции, характеризующий совокупность ее признаков, обусловленных возможным присутствием в сырье чужеродных химических веществ и организмов или их накоплением в процессе производства и хранения продукции и представляющих опасность для жизни и здоровья нынешнего и будущих поколений людей при обычных условиях их использования.

#### **3.5.1. Микробиологические показатели и нормативы контроля качества и безопасности пищевых продуктов**

Микробиологический анализ играет важную роль в оценке качества и безопасности пищевых продуктов и преследует три основные цели.

1. Контроль качества сырья, пищевых продуктов и оценка санитарно-гигиенических условий их изготовления.

2. Контроль режимов хранения пищевых продуктов и оценка санитарно-гигиенических условий их транспортировки и реализации.

3. Контроль над обеспечением микробиологической безопасности пищевых продуктов.

Кроме удовлетворения физиологических потребностей человека в необходимых веществах и энергии, пищевые продукты должны соответствовать установленным нормативными документами (НД) требованиям микробиологического качества и безопасности.

Среди НД можно выделить:

– законы, соглашения, действующие на международном уровне, в отдельных странах, в странах СНГ, едином Таможенном союзе, например, закон Республики Беларусь «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения», Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю), утвержденные решением Комиссии Таможенного союза 28.05.2010;

– международные стандарты (ИСО 9000, ИСО 22000 и др.) и отечественные стандарты (СТБ 1470–2004), устанавливающие основные требования к системе управления качеством и безопасностью пищевых продуктов на основе НАССР;

– отдельные стандарты по методам отбора и подготовки проб к анализам, методам контроля показателей качества и безопасности продукции;

– СанПиНы, устанавливающие санитарно-гигиенические нормативы показателей качества и безопасности по группам пищевых продуктов, ветеринарные и фитосанитарные правила и нормы;

– ТУ, регламенты на отдельные виды продукции; инструкции, МУ и другие вспомогательные НТД.

Безопасность пищевых продуктов в странах СНГ оценивается по гигиеническим нормативам, которые включают биологические объекты, потенциально опасные химические соединения, радионуклиды и вредные примеси. Присутствие их в пищевых продуктах не должно превышать допустимых уровней содержания в заданной массе (объеме) исследуемой продукции.



Указанные показатели безопасности установлены для 11 групп продуктов (мясомолочные, рыбные, кондитерские, плодоовощные, продукты детского питания и др.).

Эпидемиологическая и санитарно-микробиологическая безопасность пищевых продуктов определяются, прежде всего, по микробиологическим показателям.

Микробиологический контроль осуществляется за четырьмя группами микроорганизмов: порчи, санитарно-показательными, потенциально-патогенными и патогенными (табл. 1).

Таблица 1

**Перечень микробиологических показателей,  
регламентируемых в Республике Беларусь и дополнительно  
выявляемых в пищевых продуктах**

Микробиологические показатели	В соответствии с СанПиН 11 63 РБ 98 (основные)	Рекомендуемые (дополнительные)
Микроорганизмы порчи	КМАФАнМ, плесневые грибы, дрожжи, молочнокислые бактерии	Количество психрофильных микроорганизмов
Санитарно-показательные микроорганизмы	колиформные бактерии, БГКП, <i>E. coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i>	Энтерококки ( <i>S. faecalis</i> , <i>S. faecium</i> )
Потенциально-патогенные микроорганизмы	<i>E. coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Сульфитредуцирующие клостридии ( <i>Cl. perfringens</i> )
Патогенные микроорганизмы	<i>Cl. botulinum</i> , <i>S. aureus</i> , бактерии рода <i>Salmonella</i> , эпидемиологически опасные микроорганизмы 1-й, 2-й групп патогенности	Энтеропатогенная <i>E. coli</i> , клебсиеллы, иерсинии, шигеллы, патогенные вибрионы, листерии, кампилобактер, <i>Vibrio parahaemolyticus</i>

Для оценки доброкачественности продукции в странах СНГ используют самый распространенный микробиологический тест – определение КМАФАнМ (табл. 2).

Таблица 2

**Оценка качества пищевых продуктов по показателю КМАФАнМ**

Группа	КМАФАнМ, КОЕ/г (см <sup>3</sup> )	Качество продукта
I	10 <sup>3</sup> –10 <sup>4</sup>	Высококачественный продукт по зарубежным стандартам

Окончание табл. 2

Группа	КМАФАнМ, КОЕ/г (см <sup>3</sup> )	Качество продукта
II	$1 \cdot 10^4 - 1 \cdot 10^5$	Доброкачественный, стойкий при хранении, соответствует высшему качеству в странах СНГ
III	$1 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$	Безопасный, но пониженной сортности в зависимости от содержания микроорганизмов. Нарушен санитарно-гигиенический режим производства
IV	$10^6 - 10^7$	Потенциально опасный как источник патогенных микроорганизмов и их токсинов
V	$10^7 - 10^8$	Продукт испорчен и наблюдается органолептически

### 3.5.2. Стадии микробиологического анализа пищевых продуктов

Микробиологический анализ пищевых продуктов включает ряд стадий: отбор и подготовка проб, проведение микробиологических испытаний и оценка качества измерений, заключение о микробиологической безопасности и качестве продукции.

#### 1. Отбор проб продукции для проведения микробиологических испытаний

Отбор проб пищевых продуктов для проведения микробиологических анализов осуществляют в соответствии с указанными в списке использованных источников нормативными документами на отдельные товары.

Нормы отбора проб зависят от объема партии, цели испытаний и регламентируются на каждый вид продукции.

Отбор проб продукции для микробиологических испытаний состоит из следующих этапов: отбора выборок, отбора точечных проб, составления объединенной пробы, выделения средней пробы.

Для сыпучих пищевых продуктов усредненная проба отбирается в пяти местах на разной глубине, общей массой 1 кг.

Для колбасных изделий отбирают не менее трех точечных проб (по краям, в центре), массой 250 г каждая, и составляют среднюю пробу.

Для молока и молочных продуктов отбор проб для микробиологических анализов проводят по ГОСТ 26809–86.

Перед отбором проб жидкий образец перемешивают, после чего отбирают точечные пробы и составляют объединенную пробу объемом 1 дм<sup>3</sup>.

Объединенные пробы для бактериологических испытаний помещают в стерильную посуду, маркируют. На этикетке указывают: наименование продукта; номер пробы и партии продукта; дату и время отбора проб.

Пробы пломбируют и отправляют в лабораторию для анализа. К ним прикладывают акт отбора проб с указанием реквизитов предприятия-изготовителя, характеристик продукции и цели испытания.

При характеристике продукции отмечают: вид, сорт продукции, размер партии; дата выработки, номер смены, время выработки, срок годности; НТД, по которой выработан продукт; номер документа сдачи-приемки партии.

При характеристике отбираемых проб приводятся: ГОСТ, в соответствии с которым отобраны пробы; место, дата и время отбора проб; номер пробы; цель испытания (анализ общей бактериальной загрязненности, определение содержания санитарно-показательных микроорганизмов и т. д.).

В акте отбора проб приводятся также Ф. И. О., должность лиц, принимавших участие в осмотре и отборе проб, и их роспись.

Общие правила для микробиологических испытаний всех пищевых продуктов включают:

- 1) отбор образцов для микробиологического анализа ответственным лицом в присутствии представителей предприятия;
- 2) соблюдение условий стерильности при отборе проб;
- 3) процедуру усреднения образцов путем составления объединенной пробы;
- 4) охлаждение проб до температуры не выше 10°C;
- 5) проведение микробиологических измерений не позже 4 ч после отбора проб.

## **2. Подготовка проб для микробиологического анализа**

Процедура подготовки проб сельскохозяйственного сырья и пищевых продуктов для микробиологического анализа различается в зависимости от консистенции продукта и наличия защитной оболочки, а также от цели микробиологических испытаний.

Перед проведением испытаний отобранные жидкие пробы перемешивают путем перевертывания посуды с пробами не менее трех раз.

Пробы, имеющие густую консистенцию, нагревают на водяной бане до температуры 30°C. Твердые и сухие пробы гомогенизируют.

низируют или растирают в ступке до получения однородной консистенции.

Продукты в оболочке исследуют в глубине продукта. Продукты без оболочки исследуют с поверхности и в глубине продукта.

Для анализа бактериальной загрязненности поверхности продуктов делают смыв с площади  $100 \text{ см}^2$ . Стерильным ватным тампоном, слегка смоченным физиологическим раствором, обтирают анализируемую поверхность через приложенный трафарет площадью  $10\text{--}100 \text{ см}^2$ . Смыв делается штриховыми движениями в одну сторону, а затем – в перпендикулярном направлении. Тампон помещают в стерильные пробирки, содержащие  $5 \text{ см}^3$  физиологического раствора или питательной среды. Для каждого образца используют новый тампон.

Для анализа глубинных участков продукта образцы помещают в металлическую посуду, смачивают спиртом и обжигают. Затем делают продольный разрез на  $3/4$  глубины продукта и отбирают точечные навески с общей массой  $50 \text{ г}$  в трех местах (по концам и в середине продукта).

Из объединенной пробы каждого образца берут навеску массой  $25 \text{ г}$  с погрешностью, не превышающей  $0,1 \text{ г}$ , и помещают в стерильную фарфоровую ступку. Добавляют немного стерильного кварцевого песка и  $10 \text{ см}^3$  ФР, растирают образец вручную до кашцеобразного состояния и вносят еще  $65 \text{ см}^3$  ФР.

При использовании автоматического гомогенизатора навеску продукта вносят в  $75 \text{ см}^3$  стерильного ФР и гомогенизируют в течение  $2,5 \text{ мин}$  при  $1000 \text{ об/мин}$  и выше.

Полученную суспензию или растертый гомогенат анализируют далее при микробиологических испытаниях.

### **3. Проведение микробиологических испытаний и оценка качества измерений**

Для определения численности микроорганизмов используют качественные (бактериоскопия свежести продукции), полуколичественные (редуктазная проба, бродильная проба и др.) и количественные арбитражные методы анализа, основанные на методах посева и культивирования микроорганизмов на чашках или подложках. В последнем случае отбирают  $1 \text{ см}^3$  ( $1 \text{ г}$ ) продукта, готовят десятикратные разведения в зависимости от предполагаемой степени загрязненности пищевых продуктов микроорганизмами.

Приготовленные разведения высевают на чашки Петри с микробиологическими питательными средами.

После культивирования образцов в термостате при оптимальных условиях развития микроорганизмов в течение 1–10 сут подсчитывают число выросших колоний клеток и определяют содержание микроорганизмов в пищевом продукте. Измерения проводят с учетом 2–3-кратной повторности опытов. Результаты анализа обрабатывают статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel.

Качество выполненных работ считается удовлетворительным, если относительная погрешность измерений не более  $\pm 20\%$ .

После завершения микробиологического анализа при работе с микроорганизмами III–IV класса опасности обеззараживание использованных сред и посуды проводят в соответствии с санитарными правилами СП 1.2.731–99. Чашки с посевами микроорганизмов освобождают от содержимого, тщательно моют в 0,125%-ном горячем растворе карбоната натрия. Выдерживают в растворе 0,1 н НС1 или других дезинфектантах, промывают дистиллированной водой. Обеззараживание производят в автоклаве или в сушильном шкафу.

#### **4. Заключение о микробиологической безопасности и качестве пищевых продуктов**

По результатам проведенного микробиологического анализа делается заключение о пригодности пищевого продукта к употреблению человеком либо его условной годности и необходимости дополнительной обработки. В случае непригодности продукции к употреблению человеком или животными она может быть направлена на техническую утилизацию или на уничтожение при обнаружении эпидемиологически опасных возбудителей заболеваний.

Основным гигиеническим критерием качества и безопасности пищевых продуктов является соответствие качественного состава и количественного содержания контролируемых групп микроорганизмов нормируемым микробиологическим показателям, представленным в нормативно-технической документации. Продукция признается безопасной, если в ней отсутствуют патогенные и потенциально патогенные микроорганизмы или их содержание не превышает допустимых норм.

**Лабораторная работа № 3**  
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ КМАФАнМ И САНИТАРНО-**  
**ПОКАЗАТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**  
**В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ**

Цель работы – освоение методов микробиологического контроля на примере анализа молока и молочных продуктов.

Общие требования к молоку сырью для всех видов молочных продуктов определены в СТБ 1598–2006 «Молоко коровье. Требования при закупках» и в Санитарных нормах, правилах и гигиенических нормативах «Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов», утвержденных постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 9.06.2009, № 63. Специфические требования к молоку сырью для сыроделия определены в техническом регламенте ТР 2010/018/ВУ «Молоко и молочная продукция. Безопасность».

Микробиологические исследования молока и молочных продуктов выполняют в соответствии с ГОСТ 9225–84, ГОСТ 30519–97, ГОСТ 10444.11–89, ГОСТ 10444.12–88, ГОСТ 30347–97, ГОСТ Р 51921–2002, ГОСТ 29185–91, ГОСТ 7702.2.2–93, МР 2.3.2.2327–08 «Методические рекомендации по организации производственного микробиологического контроля на предприятиях молочной промышленности. Детские продукты питания анализируют в соответствии с МУК 4.2.577–96, ГОСТ 30705–2000, ГОСТ 30706–2000.

Микробиологический анализ молока и молочных продуктов включает оценку показателей: КМАФАнМ, содержания БГКП, *E. coli*, микроорганизмов порчи (дрожжей, плесеней) и патогенов.

Отбор проб массой 25 г осуществляются из усредненного образца. Подготовка проб проводится в соответствии с консистенцией продукции. Твердые продукты гомогенизируются механически до пастообразного состояния, а затем, как и сухое молоко, предварительно разводятся в стерильном ФР. Жидкие продукты отбирают пипеткой без предварительной обработки.

**1. Определение КМАФАнМ в молоке и молочных продуктах методом посева и культивирования микроорганизмов**

*Ход работы*

1. Для анализа общего содержания бактерий в молоке и молочных продуктах методом посева и культивирования на чашках

(или подложках) из навески усредненной пробы готовят последовательные разведения.

Для этого в четыре пробирки разливают по 4,5 см<sup>3</sup> ФР и вносят в первую пробирку 0,5 см<sup>3</sup> (г) продукта. После тщательного перемешивания из него новой пипеткой отбирают 0,5 см<sup>3</sup> суспензии и переносят в следующую пробирку.

2. Затем по 1 см<sup>3</sup> последнего и предпоследнего разведений высевают глубинным способом в две чашки с ПА.

3. После застывания среды засеянные чашки Петри помещают в термостат и культивируют при 30°C 3 сут.

4. Для подсчета выбирают чашки, в которых колонии изолированы одна от другой и количество их находится в пределах 50–300. Чашки помещают вверх дном на темный фон и считают колонии с помощью лупы с увеличением 8–10 раз. Каждую сосчитанную колонию отмечают на наружной стороне чашки маркером. Полученные результаты заносят в табл. 3.

Таблица 3

**Определение КМАФАнМ в молоке и молочных продуктах  
методом посева и культивирования**

Наименование продукта	Образцы	$f$	$a_i$	$N_i$ , КОЕ/см <sup>3</sup>	$N_{cp}$ , КОЕ/см <sup>3</sup>	СКО <sub>cp</sub> , КОЕ/см <sup>3</sup>	$\varepsilon$ , %
Молоко пастеризованное	1	3					
	2	3					
	3	4					
Сухая молочная смесь	1	3					
	2	3					
	3	4					

5. Качество микробиологических измерений оценивают по величине относительной погрешности определения общего количества микроорганизмов, которая не должна превышать  $\pm 20\%$ .

6. Анализ микробиологического качества молока и молочных продуктов проводят, сравнивая полученные результаты с нормативными требованиями СанПиН.

## 2. Методы определения содержания дрожжей и плесеней

Культивирование грибов на питательных средах, содержащих смесь антибиотиков пенициллина и стрептомицина, позволяет по-

давить развитие бактерий и выделить культуры дрожжей и плесеней, а также провести их количественный учет и дифференциацию.

Микроорганизмы порчи контролируются не для всех групп молочных продуктов, а только для сухих молочных смесей, кисломолочных продуктов, сыров.

### *Ход работы*

1. Используют исходную пробу продукта и ее десятикратное разведение в ФР.

2. По 1 см<sup>3</sup> проб высевают глубинным способом в две стерильные чашки Петри со средой Сабуро.

3. После застывания среды засеянные чашки выдерживают при комнатной температуре в течение 5 сут.

4. Содержание выросших колоний дрожжевых и плесневых грибов подсчитывают отдельно. Дрожжи образуют выпуклые, крупные, блестящие, серовато-белые колонии с гладкой поверхностью и ровным краем. Плесневые грибы на агаризованных питательных средах формируют мицелий различной окраски. При необходимости идентификации дрожжей и плесеней в сомнительных случаях колонии наблюдают с помощью микроскопа методом раздавленной капли.

Для количественного подсчета дрожжей (д) и плесневых грибов (п) отбирают чашки, на которых выросло от 15–150 колоний дрожжей и 5–50 колоний на чашку для плесневых грибов. Результаты заносят в табл. 4.

Таблица 4

#### **Определение содержания дрожжей и грибов в молочной смеси методом посева и культивирования**

Наименование продукта	Образцы	$f$	$a_i$		$N_i$ , КОЕ/см <sup>3</sup>		$N_{ср}$ , КОЕ/см <sup>3</sup>		СКО <sub>ср</sub> , КОЕ/см <sup>3</sup>		$\varepsilon$ , %	
			д	п	д	п	д	п	д	п	д	п
Сухая молочная смесь	1	0										
	2	1										

### *Оценка результатов*

1. Микробиологические измерения считаются качественными, если относительная погрешность не превышает  $\pm 20\%$ .

2. Сравнивают содержание микроорганизмов с допустимыми нормами в соответствии с требованиями СанПиН для данного



продукта. Допустимое содержание дрожжей и плесеней не должно превышать 50 КОЕ/г.

### **3. Определение бактерий группы кишечных палочек и *E. coli* в молоке**

Определение присутствия БГКП в молоке основано на способности колиформных бактерий сбраживать лактозу в среде Кесслер с образованием кислоты и газовой выделением.

#### ***Ход работы***

1. В три пробирки разливают по 5 см<sup>3</sup> среды Кесслер и вносят в них по 1 см<sup>3</sup> разведения 1 : 10 пробы молока. Помещают засеянные пробирки в термостат (37°C, 24–48 ч).

2. На следующие сутки просматривают пробирки с посевами и по наличию газообразования, помутнения и изменения цвета среды отмечают присутствие в молоке колиформных бактерий – БГКП (+). При отсутствии указанных признаков через 48 ч изделия считаются незагрязненными – БГКП (–).

3. Для идентификации БГКП из пробирок, в которых наблюдается брожение, проводят посев на среду Эндо. Чашку размечают на количество секторов для каждой пробирки с БГКП (+) и засевают каждый сектор бактериологической петлей методом исчерпывающего штриха, чтобы получить изолированные колонии.

4. Посевы инкубируют при 37°C в течение суток. При отсутствии красных с металлическим блеском колоний, характерных для *E. coli*, продукт считается не загрязненным кишечной палочкой.

5. Подозрительные колонии при их наличии подвергают дальнейшей идентификации по ТИМАЦ-тестам, основными из которых являются: Ц-тест (цитратный тест на среде Козера); Т-тест (температурный тест с глюкозой).

6. Для проведения Ц-теста подозрительные колонии из каждого сектора среды Эндо засевают бактериологической петлей в среду Козера, помещают в термостат при 37°C на сутки. Изменение оливково-зеленого цвета среды Козера на васильковый обозначают Ц (+). Это свидетельствует о том, что выявленные БГКП принадлежат цитратположительным разновидностям, которые не подсчитывают. *E. coli* Ц (–), т. е. не способна утилизировать цитратную среду Козера, в результате чего ее цвет не должен меняться.

7. Для проведения Т-теста в пробирки с глюкозой вносят отдельные подозрительные колонии со среды Эндо и термостатируют посеvy в течение суток при 43–44°C. Помутнение глюкозной среды при 44°C обозначается Т (+) и указывает на присутствие *E. coli*.

Полученные результаты заносят в табл. 5.

Таблица 5

#### Определение БГКП и *E. coli* в молоке и мороженом

Наименование продукта	Бродильная проба (среда Кесслер)			Присутствие <i>E. coli</i> (среда Эндо)			Цитратный тест на среде Козера			Т-тест 44°C	Содержание <i>E. coli</i>
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
Молоко пастеризованное											
Сухая молочная смесь											

#### Оценка результатов

1. Титр БГКП определяют по количеству (+) пробирок с учетом разведения пробы. Для молока и молочных продуктов титр БГКП не должен быть ниже 0,01 или 1,0 г в соответствии с требованиями СанПиН для отдельных видов молочной продукции.

2. Результаты бродильной пробы – БГКП (+/-), Эндо (-), Т (-), Ц (+) указывают на отсутствие *E. coli* в молоке и молочных продуктах.

3. При БГКП (+), Эндо (+), Т(+), Ц (-) в продукте присутствует *E. coli*. Количественное значение коли-титра находят по количеству (-) пробирок в цитратном тесте. Полученные значения коли-титра сравнивают с допустимыми значениями для данного продукта, приведенными в СанПиН.

#### 4. Методы обнаружения патогенных микроорганизмов

Обнаружение патогенных микроорганизмов, в том числе сальмонелл, в молоке и молочных продуктах проводят по ГОСТ 30519–97.

Выявление сальмонелл осуществляется в несколько этапов.

1. Высев и инкубирование определенной навески продукта в жидкой селективной среде для предварительного обогащения патогенами и подавления развития посторонней микрофлоры.

2. Посев микроорганизмов из обогащенной среды на агаризованные дифференциально-диагностические среды и культивирование патогенов при оптимальных условиях их роста.

3. Идентификация выросших колоний проводится по морфологическим, серологическим или физиолого-биохимическим признакам (рис. 16).

Номер ряда ячеек	Номер столбца ячеек планшета											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												

Рис. 16. Схема размещения реагентов в столбцах ячеек планшета со средой: 1 – среда с мочевиной (реакция на уреазу); 2, 3 – с триптофаном (реакция на триптофандезаминазу, индол); 4 – с лизином (реакция на лизиндекарбоксилазу); 5 – среда Кларка на ацетоин; 6 – среда на сероводород; 7 – среда с лактозой; 8 – среда с сахарозой; 9 – среда с сорбитом; 10 – среда с маннитом; 11 – с арабинозой, 12 – контроль (ПБ)

В ячейки каждого столбца (кроме 12-го) вносят соответствующую среду для идентификации микроорганизмов. Ряды ячеек используют для отдельных культур или колоний клеток. В каждую ячейку одного ряда планшета вносят бактериологической петлей анализируемую культуру клеток, тщательно перемешивают, оставляют в термостате на сутки и затем отмечают наличие (+) или (–) реакции.

### *Ход работы*

1. В среду обогащения, например селенитовый бульон, в объеме 75 см<sup>3</sup> вносят 25 г продукта, пробу гомогенизируют и инкубируют при 37°C 24–48 ч.

2. Высевают 0,1 см<sup>3</sup> обогащенной среды на поверхность дифференциально-диагностических сред: висмут-солевой агар, среду Плоскирева, среду Эндо. Посевы инкубируют 24–48 ч при 37°C.

3. Анализируют морфологические признаки выросших колоний: на висмут-солевом агаре сальмонеллы образуют черные или коричневые с металлическим блеском колонии, на средах Плоскирева, Эндо – бесцветные прозрачные колонии.

4. Отбирают подозрительные колонии и высевают на среду с желчью, культивируют в течение суток при 37°C.

5. Выросшие колонии, подозрительные на сальмонеллы, подвергают ускоренной (5 ч) биохимической идентификации методом микрокультур в 96 ячеечных планшетах (рис. 16).

В день исследования в планшеты вносят в вертикальные ряды (1–12) по 0,1 см<sup>3</sup> дифференциально-диагностических сред.

На одну культуру используют 1 горизонтальный ряд. Планшеты закрывают крышкой и инкубируют 4 ч при 37°C, после чего учитывают результаты.

### Оценка результатов

1. Желтый цвет среды с мочевиной меняется на красный при наличии уреазы.

2. В присутствии индола появляется красное кольцо при введении капли реагента Ковача.

3. Наличие лизинкарбоксилазы обнаруживают по изменению цвета среды с желтого на синий или зеленый.

4. Образование сероводорода регистрируют по появлению черного осадка на дне лунки.

5. Ферментацию углеводов (лактозы, сахарозы, маннита, сорбита, арабинозы – по изменению цвета среды с красного на желтый).

6. Ацетоин обнаруживают по появлению розового окрашивания при внесении в лунку по 1 капле 12%-ного раствора нафтола и 40%-ного КОН и дополнительного выдерживания пробы при 37°C в течение 1 ч.

7. Идентификацию клеток проводят с помощью табл. 6.

Таблица 6

Схема биохимической идентификации отдельных видов энтеробактерий микрообъемным методом в планшетах

Микроорганизмы	Среды										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	+	–	–	–	–	+	–	–	–
<i>Salmonella typhi</i>	–	–	–	+	–	–	–	–	+	+	–
<i>Salmonella spp.</i>	–	–	–	+	–	+	–	–	+	+	+
<i>E. coli</i>	–	–	+	+	–	–	+	+/-	+	+	+
<i>Shigella spp.</i>	–	–	+/-	–	–	–	–	–	+/-	+	-/+

*Примечание:* 1 – среда с мочевиной (реакция на уреазу); 2, 3 – с триптофаном (реакция на триптофандезаминазу, индол); 4 – с лизином (реакция на лизиндекарбоксилазу); 5 – среда Кларка на ацетоин; 6 – на сероводород; 7 – среда с лактозой; 8 – с сахарозой; 9 – с сорбитом; 10 – с маннитом; 11 – с арабинозой.

### Задание

1. Определить КМАФАнМ в молоке, сухой молочной смеси.
2. Проверить наличие БГКП в молоке и смеси.
3. Провести идентификацию *E. coli* среди БГКП и определить коли-титр.
4. Оценить содержание дрожжей и плесеней в сухой молочной смеси.
5. Проверить присутствие патогенов в молоке.

**Материалы и оборудование.** Образцы молока и молочных продуктов; питательные среды: селенитовый бульон, среда Кесслер, питательный агар, висмут солевой агар, среда Козера, среда Эндо, среда Плоскирева, среда Сабуро, среды с глюкозой, лактозой, триптофаном, лизином, маннозой, арабинозой, сорбитом, физиологический раствор. Световой микроскоп и принадлежности к нему, микробиологические петли, пинцеты, стеклянные палочки, спиртовки, предметные и покровные стекла, предметные стекла с лунками, фильтровальная бумага, наборы красителей, ванночки и рейки для окрашивания образцов, термостат, сушильный шкаф, автоклав.

### Вопросы для самопроверки

1. Что такое качество и безопасность пищевых продуктов и как на них влияет содержание микроорганизмов.
2. Что входит в систему микробиологического контроля качества и безопасности пищевых продуктов?
3. Какие цели преследует микробиологический анализ, и из каких этапов он состоит?
4. Какие группы микробиологических показателей контролируются для характеристики качества и безопасности продукции?
5. Что такое КМАФАнМ и как его определить?
6. Как оценить микробиологическое качество и безопасность пищевых продуктов?
7. Как оценить качество микробиологических измерений?
8. На чем основано определение БГКП в молоке и молочных продуктах?
9. Как идентифицировать *E. coli* среди БГКП и определить коли-титр?
10. Каков порядок определения содержания дрожжей и плесеней в молочных продуктах?

11. Как проводится обнаружение и идентификация патогенных микроорганизмов в молоке и молочных продуктах?

### Литература

1. Степаненко, П. П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии молока и молочных продуктов / П. П. Степаненко. – М.: Лира, 2005. – 653 с.

2. Позняковский, В. М. Гигиенические основы питания: качество и безопасность пищевых продуктов: учебник / В. М. Позняковский. – 4-е изд., испр. и доп. – Новосибирск: Сибир. ун-т, 2005. – 522 с.

3. Ганина, В. И. Техническая микробиология продуктов животного происхождения: учеб. пособие / В. И. Ганина, Н. С. Королева, С. А. Фильчакова – М.: ДеЛипринт, 2008. – 352 с.

4. Жарикова, Г. Г. Микробиология продовольственных товаров. Санитария и гигиена: учебник / Г. Г. Жарикова. – 3-е изд. – М.: Академия, 2008. – 300 с.

5. Меркулова, Н. Г. Производственный контроль в молочной промышленности / Н. Г. Меркулова. – М.: Колос, 2007. – 310 с.

6. Жвирблянская, А. Ю. Микробиология в пищевой промышленности / А. Ю. Жвирблянская, О. А. Бакушинская. – М.: Пищевая пром-сть, 1975. – 320 с.

7. Блекберн, К. де В. Микробиологическая порча пищевых продуктов / К. де В. Блекберн; пер. с англ.; под общ. ред. Д. К. Рапопорт. – СПб.: Профессия, 2008. – 784 с.

### 3.6. Современные методы микробиологического анализа

Методы посева и культивирования микроорганизмов позволяют определить общую загрязненность оборудования, помещений, сырья, материалов и готовой продукции, а также эффективность моющего-дезинфицирующих средств.

Существенными недостатками данных методов, сдерживающих развитие производства, являются:

– необходимость в хорошо оснащенной микробиологической лаборатории для проведения анализов;

– использование квалифицированного персонала микробиологов;

- значительная продолжительность анализов (несколько дней), что не позволяет оперативно контролировать и управлять производством;
- высокая трудоемкость анализов, большой расход дорогостоящих микробиологических питательных сред;
- высокая себестоимость анализов, что вызывает необходимость проведения выборочного, периодического контроля;
- невозможность автоматизации измерений.

Все это требует совершенствования микробиологического контроля и разработки простых, быстрых, чувствительных и недорогих методов микробиологического анализа.

#### **Лабораторная работа № 4** **БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД АНАЛИЗА** **МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЗАГРЯЗНЕННОСТИ** **ПОВЕРХНОСТЕЙ**

Цель работы – освоение студентами новых методов биолюминесцентного анализа санитарно-микробиологической чистоты производства и анализа эффективности мойки и дезинфекции оборудования и помещений.

Существующие методы биолюминесцентного анализа основаны на измерении интенсивности биолюминесценции смывов с поверхности оборудования и стен помещений. Измерение биолюминесценции в смывах проводят на люминометре «SystemSure II» производства Hugieta LLC, Великобритания, с помощью устройства «Ultrasnap™ ATP» (рис. 17).



Рис. 17. Внешний вид биолюминометра «SystemSure II»  
и устройства «Ultrasnap™ ATP»

Работа люминометра «SystemSure II» основана на измерении количества АТФ, присутствующей во всех живых клетках, при введении в тестируемую среду реагентов, включающих люциферин-люциферазный комплекс.

Анализ санитарной чистоты объектов биолюминесцентным методом рекомендуют проводить в соответствии с табл. 7.

Таблица 7

**Критерии микробиологической загрязненности  
поверхности оборудования**

Объекты исследования	Показатели чистоты оборудования в RLU		
	Чистое	Недостаточно чистое	Грязное
Вода ополаскивания	Менее 7	8–15	Более 15

Недостатком данного подхода является качественный или полуквантитативный анализ, а также невозможность оценки влияния целого ряда факторов на интенсивность биолюминесцентного свечения.

Для разработки метода количественного биолюминесцентного анализа содержания микроорганизмов в смывах необходимо построить калибровочную зависимость между интенсивностью биолюминесценции и численностью микроорганизмов, определенной арбитражным методом, найти регрессионное уравнение, а также провести его проверку на реальных объектах и оценить метрологические параметры МВИ.

***Ход работы***

1. В полимерную пробирку устройства «Ultrasnap<sup>TM</sup> АТФ» помещают 0,1 мл смыва (для жидких сред) или увлажненный тампон, которым предварительно была протерта поверхность площадью 100 см<sup>2</sup>, затем активизируют устройство «Ultrasnap<sup>TM</sup> АТФ» и измеряют интенсивность биолюминесценции образцов с помощью биолюминометра «SystemSure II».

2. Результаты измерений интенсивности свечения образцов при тестировании методом АТФ-биолюминесцентрии выражают в условных единицах RLU, которые показывают общее количество света, испускаемое пробой.

$$1 \text{ RLU} = 1 \text{ fmol} = 10^{-15} \text{ M.} \quad (18)$$



3. Для количественного определения содержания микроорганизмов билюминесцентным методом вначале строят калибровочную зависимость между интенсивностью свечения суспензии клеток с известным содержанием микроорганизмов. Для этого готовят смывы микроорганизмов с поверхностей разной степени загрязнения и их десятикратные разведения от  $10^2$  до  $10^6$  кл./см<sup>2</sup>.

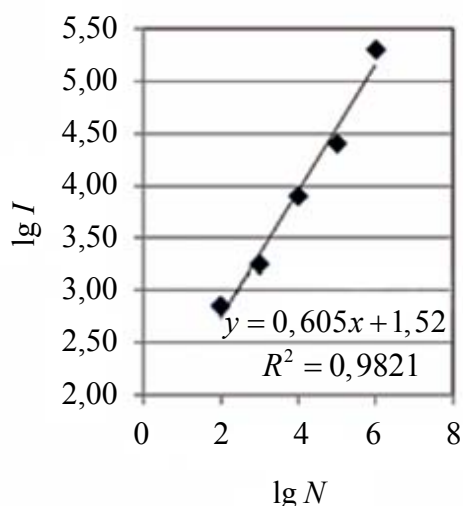


Рис. 18. Калибровочный график зависимости интенсивности билюминесценции образцов ( $I$ ) от содержания микроорганизмов ( $N$ ) в логарифмической системе координат

4. Проводят параллельное измерение интенсивности билюминесцентного свечения микроорганизмов в смывах и содержание в них клеток методом посева и культивирования образцов на подложках или чашках при 30°C в течение 3 сут.

5. Строят график зависимости интенсивности свечения от числа микроорганизмов в логарифмической системе координат (рис. 18). По полученным данным находят уравнение калибровочной зависимости с помощью программы Microsoft Excel.

Высокое значение коэффициента аппроксимации  $R^2$  калибровочной зависимости (рис. 18) указывает на то, что она носит линейный характер в диапазоне концентраций  $10^2$ – $10^6$  кл./см<sup>2</sup>. Это позволяет использовать билюминесцентный метод для быстрой оценки содержания микроорганизмов в смывах с поверхностей.

6. Используя калибровочное уравнение, находят по регистрируемому свечению пробы содержание в ней микроорганизмов. Полученное значение вносят в табл. 8.

Для проверки билюминесцентного метода проводят сравнительное испытание микробной загрязненности поверхностей до и после санитарной обработки препаратами Биомол КС-1 и Биомол КС-3 с помощью метода подложек (или методов посева и культивирования клеток на чашках) и билюминесцентным методом анализа. Полученные значения вносят в табл. 8.

Сравнивают эффективность различных методов микробиологического анализа (табл. 9).

Таблица 8

**Характеристика эффективности обработки поверхностей по данным двух методов подсчета микроорганизмов**

Место отбора проб	Контаминация до мойки, кл/см <sup>2</sup>		Контаминация после проведения мойки, кл/см <sup>2</sup>	
	Метод подложек	БЛМ	Метод подложек	БЛМ
Стол в лаборатории				
Пол в лаборатории				
Стена в лаборатории				
Стена в кабинете				

Таблица 9

**Сравнение эффективности методов микробиологического анализа**

Показатель	Метод посева	Метод подложек	Метод билюминесценции
Длительность, ч	72	72	0,033
Погрешность, %	20	20	10–12
Чувствительность, кл/см <sup>2</sup>	1	1	10 <sup>1</sup> –10 <sup>2</sup>
Расход питательных сред	Большой	Низкий	Отсутствует
Трудоемкость	Высокая	Средняя	Низкая
Стоимость анализа	Высокая	Средняя	Низкая

Как видно из табл. 9, метод подложек снижает трудоемкость анализа и расход питательных сред, но не позволяет сократить длительность анализа. Метод билюминесценции сокращает длительность анализа с 72 ч до 1 мин, при этом значительно снижается трудоемкость анализа. Нижняя граница определения микроорганизмов билюминесцентным методом находится на уровне 10<sup>2</sup> кл/см<sup>2</sup>.

Таким образом, метод билюминесценции является хорошей альтернативой методов посева и культивирования клеток на чашках и подложках. Он позволяет проводить контроль санитарно-гигиенической чистоты оборудования и помещений, а также оценку эффективности процессов их мойки и дезинфекции в реальном времени.

### Задание

1. Приготовить смывы с поверхностей стен помещений, поверхностей оборудования.

2. Провести параллельный анализ содержания микроорганизмов в смывах методами посева и культивирования на чашках, подложках и методом билюминесценции.

3. Построить уравнение калибровочной зависимости содержания микроорганизмов в смывах от интенсивности билюминесцентного свечения проб.

4. Определить степень загрязненности различных поверхностей билюминесцентным методом и сравнить его показания с методами посева и культивирования микроорганизмов.

5. Оценить метрологические характеристики использованных методов микробиологического анализа.

**Материалы и оборудование.** Автоклав паровой; шкаф сушильный лабораторный типа Н561А; термостат, обеспечивающий температуру 27–37 °С; холодильник бытовой электрический; световой биологический микроскоп «Биолам» и принадлежности к нему; рН-метр рН-340, аналитические весы СЦ 2020, люминометр «SystemSure II» с устройством «Ultrasnap<sup>™</sup> АТР», подложки RIDA<sup>®</sup> COUNT, питательные среды для культивирования микроорганизмов, микробиологические петли, пинцеты, стеклянные палочки, спиртовки.

### Вопросы для самопроверки

1. В чем недостатки методов посева и культивирования микроорганизмов на чашках?

2. На чем основан билюминесцентный метод анализа содержания микроорганизмов?

3. Как построить калибровочное уравнение для билюминесцентного метода анализа?

4. Как определить микробиологическую загрязненность поверхностей билюминесцентным методом и какова длительность его анализа?

### Литература

1. Бурмакина, С. В. Система мониторинга микроорганизмов на основе генов билюминесценции / С. В. Бурмакина. – М.: Академия, 1996. – 101 с.

2. Исмаилов, А. Д. Бактериальная биолюминесценция: механизмы образования и взаимодействия с люциферазой альдегидных и флавиновых субстратов / А. Д. Исмаилов. – М.: Биохимия, 1995. – 67 с.

3. Угарова, Н. Н. Биолюминесцентные методы в микробиологии / Н. Н. Угарова, Л. Ю. Бровка // Прикладная биохимия и микробиология. – М.: МГУ, 1987. – Т. 23, № 1. – С. 14–23.

4. Инструкция по применению лабораторной системы «System SURE II». – Великобритания: Hugelina LLC, – 2004. – 59 с.

5. Фрунджян, В. Г. Биолюминесцентное определение микробной загрязненности сырого рубленого мяса / В. Г. Фрунджян, В. С. Бабунова, Н. Н. Угарова // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2, Химия. – 2002. – № 6. – С. 383–389.

6. Кудряшева, Н. С. Физико-химические основы биолюминесцентного анализа: учеб. пособие / Н. С. Кудряшева, В. А. Кратасюк, Е. Н. Есимбекова. – Красноярск, 2002 – 59 с.

7. Дерябин, Д. Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты / Д. Г. Дерябин. – М.: Наука, 2009. – 248 с.

8. Дезинфекция и антисептика в промышленности и медицине / В. А. Галынкин [и др.]. – СПб.: Фамант. – 2004. – 95 с.

9. Тамим, А. СІР-мойка на пищевых производствах / А. Тамим; пер. с англ. Е. С. Боровиковой. – СПб.: Профессия, 2009. – 288 с.

---

---

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

---

---

Микробиологический контроль качества сырья и готовой продукции является гарантией их безопасности для потребителей, сокращения затрат на их производство и важным источником повышения конкурентоспособности товаров.

Система микробиологического контроля качества и безопасности продукции базируется на существующих методах микробиологического анализа, основу которых составляют методы посева и культивирования микроорганизмов. Данные методы микробиологического анализа, ставшие уже классическими, несмотря на целый ряд достоинств, имеют существенные недостатки, которые сдерживают развитие производства.

В настоящее время требуется разработка и внедрение новых инструментальных методов микробиологического анализа. Эти методы обладают меньшей длительностью и трудоемкостью анализа, позволяют значительно повысить экономическую эффективность и снизить затраты на микробиологические исследования по сравнению с методами посева и культивирования микроорганизмов.

В приведенных лабораторных работах рассмотрены широко распространенные в практике методы качественного и количественного микробиологического анализа, основанные на световой микроскопии и методах культивирования микроорганизмов.

В процессе выполнения данных лабораторных работ студенты осваивают существующую на производстве систему методов микробиологического анализа и знакомятся с нормативной документацией микробиологического контроля пищевой продукции, а также учатся использовать полученные навыки при разработке новых инструментальных методов микробиологического анализа.

Одним из наиболее перспективных современных методов микробиологического контроля производства является метод биолюминесценции, который позволяет проводить микробиологический анализ в реальном режиме времени и значительно снижает его трудоемкость.

---

---

# ПРИЛОЖЕНИЕ 1

---

---

## НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ

### 1. Методы контроля микробиологических показателей качества и безопасности пищевых продуктов

ГОСТ 10444.7–86 Продукты пищевые. Метод выявления ботулинических токсинов и *Clostridium botulinum*.

ГОСТ 10444.8–88 Продукты пищевые. Метод определения *Bacillus cereus*.

ГОСТ 10444.12–88 Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневых грибов.

ГОСТ 28560–90 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*.

ГОСТ 30347–97 Молоко и молочные продукты. Методы определения *Staphylococcus aureus*.

ГОСТ 29185–91 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества сульфитредуцирующих клостридий.

ГОСТ 30518–97 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформные бактерии).

ГОСТ 30519–97 Продукты пищевые. Методы выявления бактерий рода *Salmonella*.

ГОСТ 10444.9–88 Продукты пищевые. Метод определения *Clostridium perfringens*.

ГОСТ 10444.15–94 Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов.

ГОСТ 26670–91. Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов.

ГОСТ 29184–91. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий семейства *Enterobacteriaceae*.

ГОСТ 30726–2001 Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий вида *Escherichia coli*.

ГОСТ Р 50474–93 Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий).

ГОСТ Р 51446–99 Микробиология. Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований.

ГОСТ Р 51921–2002 Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий *Listeria monocytogenes*.

ГОСТ Р 52415–2005 Молоко натуральное коровье – сырье. Люминесцентный метод определения количества мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов.

## **2. Методы отбора и подготовки проб пищевых продуктов**

СТБ 1036–97 Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора и подготовки проб для определения показателей безопасности.

ГОСТ 26809–86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовки проб к анализу.

ГОСТ 13928–84 Молоко и сливки заготавливаемые. Правила приемки, методы отбора проб и подготовки их к анализу.

ГОСТ 26669–85 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов.

Инструкция по подготовке проб продуктов питания для микробиологических исследований.

## **3. Нормативно-допустимые показатели загрязненности пищевых продуктов микроорганизмами**

СанПИН 11-63–98 Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов.

СанПиН 2.3.2.1078–01 Продовольственное сырье и пищевые продукты: Гигиенические требования безопасности пищевой ценности пищевых продуктов. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы.

СанПин 42-123-4423–87 Нормативы и методы микробиологического контроля продуктов детского питания, изготовленных на молочных кухнях системы здравоохранения.

Медико-биологические требования и санитарные нормы качества продовольственного сырья и пищевых продуктов.

СП 1.2.731–99 Санитарные правила. Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности и гельминтами.

СТБ 1598–2006 Молоко коровье. Требования при закупках.

Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 9.06.2009, № 63.

#### **4. Статистические методы и менеджмент контроля качества продукции**

ГОСТ 8.010–99 Методики выполнения измерений. Основные положения.

СТБ ИСО 2602–2008 Статистическая интерпретация результатов испытаний. Определение математического ожидания. Доверительный интервал.

СТБ ИСО 5725-2–2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 2: Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений.

СТБ ИСО 5725-6–2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 6: Использование значений точности на практике.

СТБ ИСО 5725-1–2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 1: Общие принципы и определения.

Ефремова, Н. Ю. Оценка неопределенности в измерениях: практ. пособие / Н. Ю. Ефремова. – Минск: БелГИМ, 2003. – 50 с.

ТК РБ 4.2-МР-15–2003 Управление качеством пищевых продуктов на основе принципов НАССР. Порядок проведения работ по анализу рисков. Методические рекомендации.



---

---

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2

---

---

### ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И РЕАГЕНТЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

#### 1. Среда Кесслер (модифицированная)

*Состав:* пептон – 10 г; лактоза – 2,5 г; желчь – 50 см<sup>3</sup>; раствор кристаллического фиолетового (10 г/дм<sup>3</sup>) – 2 см<sup>3</sup>; вода – до 1000 см<sup>3</sup>.

*Приготовление:* 16 г сухой Среды Кесслер помещают в колбу и доливают водой до 1000 см<sup>3</sup>. Смесь размешивают и кипятят при помешивании 25±5 мин. Доводят объем раствора до 1000 см<sup>3</sup> и фильтруют через вату. Разливают в пробирки с поплавками или без них по 4 см<sup>3</sup> и стерилизуют при 121±2°С в течение 10±1 мин.

#### 2. Питательная среда для определения общего количества молочнокислых бактерий

*Состав:* гидролизованное молоко – 25 г; агар – 15 г; питьевая вода – до 1000 см<sup>3</sup>.

*Приготовление:* 40 г питательной среды помещают в колбу и доливают питьевой водой до 1000 см<sup>3</sup>. Смесь перемешивают, нагревают до полного растворения агара (фильтруют при наличии осадка), устанавливают рН 6,8–7,0. Разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при 121±2 °С в течение 15±1 мин.

#### 3. Физиологический раствор

*Состав:* хлористый натрий – 8,5 г; питьевая вода – 1000 см<sup>3</sup>.

*Приготовление:* в 1000 см<sup>3</sup> воды растворяют 8,5 г хлористого натрия, разливают раствор в чистые пробирки или колбы по 100 см<sup>3</sup> и стерилизуют при 121±2°С в течение 20 мин.

#### 4. Питательные среды Сабуро

Среды Сабуро используют для культивирования грибов и плесеней, а также для их отделения от бактерий в случае добавления антибиотиков.

*Состав основы жидкой среды Сабуро:* глюкоза – 40 г; пептон – 10 г; вода – 1000 см<sup>3</sup>. В агаризованную среду Сабуро дополнительно вносят 18 г агара.

*Приготовление:* вначале готовят жидкую основу среды путем добавления компонентов в 1000 см<sup>3</sup>. Затем в нее вносят расплавленный агар. К охлажденной до 46±1°С основе среды добавляют растворы антибиотиков.

**4.1. Растворы антибиотиков.** Готовят непосредственно перед использованием.

Для приготовления раствора 1 г/дм<sup>3</sup> 1 таблетку по 0,25 г окситетрациклина дигидрата растирают в ступке, переносят порошок в колбу на 250 см<sup>3</sup>, смывая дистиллированной водой. Раствор доводят до метки дистиллированной водой.

Раствор стрептомицина концентрацией 100 г/дм<sup>3</sup> готовят путем внесения во флакон с 0,1 г антибиотика 1 см<sup>3</sup> стерильной дистиллированной воды.

Раствор пенициллина готовят путем внесения 10 см<sup>3</sup> стерильной дистиллированной воды во флакон, содержащий 1 000 000 ЕД/см<sup>3</sup> раствора.

**4.2. Питательные среды с антибиотиками для определения дрожжей и плесневых грибов.** Питательные среды с антибиотиками на основе среды Сабуро готовят непосредственно перед использованием.

*Среда агаризованная с окситетрациклином.* К 900 см<sup>3</sup> основы среды Сабуро добавляют 100 см<sup>3</sup> раствора окситетрациклина, приготовленного выше.

*Среда агаризованная с пенициллином.* К 1 дм<sup>3</sup> основы среды Сабуро добавляют 0,5 см<sup>3</sup> раствора пенициллина.

## **5. Пептонная среда**

Для приготовления пептонной среды к 100 см<sup>3</sup> дистиллированной воды добавляют 2 г пептона бактериологического, 0,5 г глюкозы, 0,1 г NaCl (химически чистый), 0,1 г дрожжевого экстракта. Доводят рН среды до 7,0. Разливают среду в бактериологические пробирки по 3 см<sup>3</sup> или конические колбы емкостью 50 см<sup>3</sup>, слоем 2 см, закрывают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют в кипящей воде в течение 1 ч или в автоклаве при 0,5 атм на протяжении 0,5 ч.

## **6. Питательный бульон (ПБ)**

Готовят из коммерческого препарата «Питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой», который содержит

панкреатический гидролизат кильки и рыбной муки и хлорид натрия. Растворяют навеску порошка в воде в пропорции, обозначенной на этикетке. Контролируют рН, разливают по флаконам и стерилизуют автоклавированием при 1 атм 20–30 мин. Используют для культивирования широкого круга бактерий.

### **7. Питательный агар (ПА)**

Готовят из коммерческого препарата «Питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой», который содержит панкреатический гидролизат кильки, хлорид натрия и агар-агар. Обычно для приготовления плотной среды требуется вносить в среду дополнительное количество агар-агар. Поскольку эта среда содержит агар-агар, который растворяется в воде только при температуре 98°C, навески порошка вносят во флаконы, заливают нужным объемом воды и стерилизуют автоклавированием при 1 атм 20–30 мин.

### **8. Сусло-бульон (СБ)**

Неохмеленное солодовое сусло отстаивают, фильтруют или освобождают от осадка центрифугированием, разбавляют дистиллированной водой до определенной плотности. Для этого в фильтрате определяют начальное содержание сахаров, пользуясь ареометром Баллинга, градусы (°Б) которого примерно соответствуют процентному содержанию сахара в растворе. Приблизительно рассчитывают степень разбавления и после доливания воды вновь определяют плотность (содержание сахаров). Среду нейтрализуют до рН 5,2–5,6, разливают во флаконы, стерилизуют при 0,5 атм 30 мин.

### **9. Сусло-агар (СА)**

Для получения плотных агаризованных сред берут небольшой избыток агар-агар в расчете на то, что в процессе стерилизации часть его подвергнется температурно-кислотному гидролизу. Во флаконы с СБ вносят агар-агар до концентрации 2,0–2,5% для плотной среды и 1,0–1,5% для полужидкой. Стерилизуют при 0,5 атм 30 мин.

### **10. Среда Эндо**

Дифференциальная среда, предназначенная для выделения энтеробактерий.

*Состав*, г/л: панкреатический гидролизат кильки – 11,5; экстракт кормовых дрожжей – 0,86; лактоза – 12,9; фуксин основной – 0,22; натрия фосфат двузамещенный – 0,48; натрия сульфит – 0,83; натрия хлорид – 3,6; натрия карбонат – 0,01; агар – 9,6; рН 7,3±0,2.

*Приготовление*. Навеску препарата, указанную на этикетке, размешать в 1 дм<sup>3</sup> дистиллированной воды, прокипятить до полного растворения агар, профильтровать и снова довести до кипения, остудить до температуры 45–50°С и разлить в стерильные чашки Петри. Среда чувствительна к свету, поэтому после приготовления она не подлежит хранению.

Лактозо (–) энтеробактерии на среде Эндо образуют бесцветные и бледно-розовые колонии. Лактозо (+) энтеробактерии образуют колонии красного цвета с металлическим блеском (*E. coli*) или без него. Рост Гр (+) микрофлоры на среде Эндо полностью ингибируется.

### 11. Среда Плоскирева

Предназначена для выделения патогенов: шигел, сальмонелл, протеев, которые образуют прозрачные колонии. Рост стафилококка на среде подавлен.

*Состав*, г/л: панкреатический гидролизат кильки – 16,0; натриевые соли желчных кислот – 8,1; лактоза – 7,6; натрия цитрат – 8,82; натрия фосфат двузамещенный – 2,25; натрия тиосульфат – 6,86; йод – 0,12; натрия карбонат – 1,42; нейтральный красный – 0,04; бриллиантовый зеленый – 0,02; агар – 8,75; рН 7,2±0,1.

*Приготовление*. Навеску препарата, указанную на этикетке, размешать в 1 дм<sup>3</sup> дистиллированной воды, прокипятить до полного растворения агар, профильтровать и снова довести до кипения, остудить до температуры 45–50°С, разлить в стерильные чашки Петри, подсушить в течение 40 мин при комнатной температуре. Среда можно использовать в течение 7 дней, если хранить в холодильнике.

### 12. Среда Кода

Используется для выделения и идентификации энтеробактерий.

*Состав*, г/л: ПБ – 8,0; лактоза – 10,0; сульфенол – 10; натрия хлорид – 3,63; бромтимоловый синий – 0,05; натрия карбонат – 0,32; рН 7,8±0,2.

*Приготовление*. Навеску препарата, указанную на этикетке, размешать в 1 дм<sup>3</sup> дистиллированной воды, прокипятить, профильтро-

вать, повторно довести до кипения и разлить в стерильные пробирки по 5 см<sup>3</sup>. Готовая среда должна быть прозрачной и зеленого цвета.

В пробирки вносят 1 см<sup>3</sup> испытуемого субстрата или его десятичных разведений и инкубируют при 37°С в течение 24 ч.

Наличие Лактозо (+) энтеробактерии определяются по помутнению и изменению цвета среды от зеленого до желтого. Помутнение среды без изменения цвета указывает на рост сальмонелл, шигелл, ЭПКП, не разлагающих лактозу. Рост стафилококка и протей ингибируется.

### 13. Среда Вильсон – Блера

Предназначена для идентификации сульфитвосстанавливающих клостридий, превращающих сернистокислый в сернокислый натрий, взаимодействующий с хлористым железом с образованием черного осадка сульфида железа.

*Приготовление.* Готовят по 100 см<sup>3</sup> раствора хлористого железа 80 г/дм<sup>3</sup>, сернистокислого натрия – 200 г/дм<sup>3</sup> в дистиллированной воде. К 100 см<sup>3</sup> расплавленного ПА, охлажденного до 80°С, добавляют 10 см<sup>3</sup> раствора сернокислого натрия и 1 см<sup>3</sup> хлористого железа. Смесь разливают в стерильные пробирки высотой по 10 см. Среду хранят в холодильнике в течение недели.

### 14. Среда Козера

Предназначена для идентификации *E. coli* и цитрат (+) микроорганизмов.

*Приготовление.* В 1 дм<sup>3</sup> дистиллированной воды растворяют 1,5 г NaNH<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,0 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,2 г MgSO<sub>4</sub>, 2,5 г лимоннокислого натрия. Раствор стерилизуют при 0,15 МПа 15 мин, добавляют к нему 10 см<sup>3</sup> спиртового раствора бромтимолового синего 5 г/дм<sup>3</sup> и разливают в стерильные пробирки по 5 см<sup>3</sup>. Готовая среда имеет зеленый цвет при pH 7,2–7,4.

### 15. Селенитовая среда

Предназначена для накопления энтеробактерий, сальмонелл, шигелл.

*Состав*, г/л: панкреатический гидролизат казеина – 5,26; натрия гидроселенит – 4,21; лактоза – 4,21; динатрия фосфат – 6,32.

*Приготовление.* Навеску препарата, указанную на этикетке, размешать в колбе с 1 дм<sup>3</sup> дистиллированной воды, нагреть до появления

первых пузырьков на дне колбы (не кипятить). Разлить в стерильные пробирки по 10 см<sup>3</sup>. Хранить в холодильнике не более 7 сут.

### **16. Среда Крумвиде – Олькеницкого в модификации Ковальчука**

Предназначена для идентификации энтеробактерий.

*Приготовление.* В 1 дм<sup>3</sup> дистиллированной воды растворяют 1 г гипосульфита натрия, 0,6 г соли Мора, 10 г мочевины, 15 г лактозы, 3,5 г сахарозы и 2 г глюкозы. Доводят рН до 7,4–7,6. Добавляют 46 г сухой питательной среды с фруктозой и индикатором. Раствор кипятят 40 мин. Разливают в пробирки по 5 см<sup>3</sup> и стерилизуют 20 мин при давлении 0,05 МПа.

### **17. Реактивы, ингибиторы, активаторы, красители**

При исследовании на наличие патогенных микроорганизмов необходимо подавлять рост сопутствующей микрофлоры. С этой целью используют различные ингибиторы. Для ингибирования роста Гр (–) микроорганизмов в состав сред вводят тетрагидрат натрия и калия, теллурид калия, ацетат таллия, селенит натрия. Для угнетения роста Гр (+) микроорганизмов используют анилиновые красители: бриллиантовый зеленый, кристаллический фиолетовый, анилиновый синий.

Желчь и соли желчных кислот используют для подавления сопутствующей Гр (+) и Гр (–) микрофлоры и стимулирования роста патогенных энтеробактерий.

При культивировании анаэробных микроорганизмов используют добавки редокс-веществ для снижения Eh среды. Для этого используют тиогликолят натрия (0,1%), цистеин (0,1%), аскорбиновую кислоту (0,1%), сульфид натрия (0,025%).

*Реактивы для окраски по Граму.* Раствор генцианового фиолетового: 1 г генцианового фиолетового растворяют в 10 см<sup>3</sup> этилового спирта и добавляют 5 г фенола. Смесь доводят водой до 100 см<sup>3</sup>.

*Раствор Люголя:* 1 г йода, 2 г КОН растворяют в 300 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Хранят раствор во флаконе из темного стекла.

*Фуксин Циля:* 1 г основного фуксина растворяют в 10 см<sup>3</sup> этилового спирта, добавляют 5 г фенола и доводят водой до 100 см<sup>3</sup>.

*Реактив № 1:* 0,5%-ный спиртовой раствор кристаллического фиолетового.

*Реактив № 2:* в 100 см<sup>3</sup> этилового спирта растворяют 0,4 г КОН. Добавляют 0,2 г кристаллического йода и 0,1 г основного фуксина. Хранят в посуде из темного стекла.

*Реактивы для окраски капсул. Концентрированный раствор карболфуксина:* 1 г фуксина смешивают с 10 см<sup>3</sup> 96%-ного этилового спирта и 100 см<sup>3</sup> раствора фенола 50 г/дм<sup>3</sup>. Для приготовления рабочего раствора карболфуксина к 10 см<sup>3</sup> концентрированного раствора добавляют 90 см<sup>3</sup> воды.

*Реактивы для окраски спор. Раствор малахитового зеленого:* 5 г малахитового зеленого растворяют в 100 см<sup>3</sup> воды. *Раствор сафранина:* 0,5 г сафранина добавляют к 100 см<sup>3</sup> воды.

# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Составитель  
**Игнатенко** Аркадий Васильевич

Редактор *Р. М. Рябая*  
Компьютерная верстка *Е. Ю. Орлова*  
Корректор *Р. М. Рябая*

Подписано в печать 30.08.2012. Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>  
Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать офсетная.  
Усл. печ. л. 6,5. Уч.-изд. л. 6,7.  
Тираж 50 экз. Заказ .

Издатель и полиграфическое исполнение:  
УО «Белорусский государственный технологический университет».  
ЛИ № 02330/0549423 от 08.04.2009.  
ЛП № 02330/0150477 от 16.01.2009.  
Ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск.