

Министерство сельского хозяйства РФ
ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяй-
ственная академия имени П.А. Столыпина»

Феоктистова Н.А., Васильев Д.А.,
Меркулов А.В., Лыдина М.А.

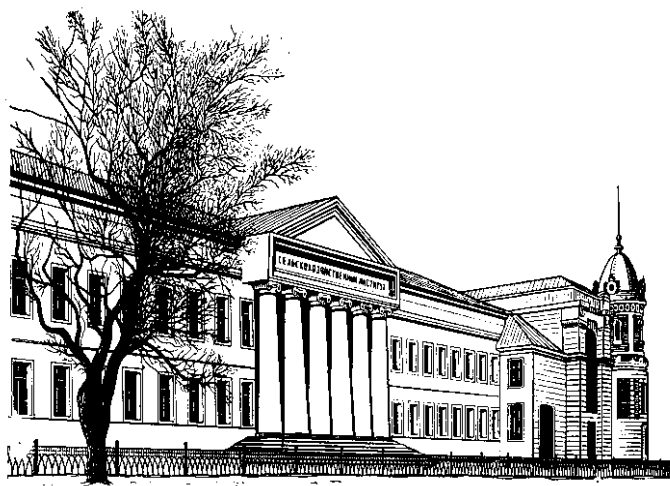
РУКОВОДСТВО К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ

по дисциплине

«ОСНОВЫ МИКРОБИОЛОГИИ»

специальность: 080401.65

«Товароведение и экспертиза товаров»



Ульяновск 2013

УДК 620.2

Составители: Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Меркулов А.В., Феоктистова Н.А.

Руководство к практическим занятиям предназначено для освоения программы по дисциплине «Основы микробиологии» специальности 080401.65 «Товароведение и экспертиза товаров» ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

Обсуждено и одобрено кафедрой «Микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ»

Рецензент: Пульчеровская Л.П. доцент кафедры «Микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ»

© ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», 2013

Лабораторно-практическое занятие № 1

Техника безопасности в бактериологической лаборатории **Устройство микроскопа. Особенности микроскопии в** **микробиологической практике (иммерсионная система)** **Формы микроорганизмов**

Цель занятия. Усвоить правила работы в бактериологической лаборатории. Ознакомиться с техникой безопасности и личной профилактикой. Освоить работу с микроскопом и особенности иммерсионной системы. Изучить формы бактерий.

Материалы и оборудование. Микроскопы, окрашенные микроскопические препараты с различными формами микроорганизмов, иммерсионное масло, мультимедийная презентация.

Методические указания. После краткого объяснения преподавателя о порядке проведения работы в лаборатории, необходимости соблюдения техники безопасности, студенты знакомятся с устройством светового микроскопа, осваивают технику микроскопии готовых препаратов, изучают морфологию микроорганизмов на препаратах и зарисовывают их в тетради.

Бактериологическая лаборатория - это учреждение для проведения бактериологических исследований при экспертизе пищевых продуктов и кормов, санитарной оценки воды, воздуха и почвы.

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

Учебная микробиологическая лаборатория предназначена для овладения студентами методами выделения и изучения различных микроорганизмов. В ней проводятся лабораторные занятия, предусмотренные программой, а также научно-исследовательская работа.

Правила работы в лаборатории

1. В помещение входить только в халате и белой шапочке (косынке).
2. В лабораторию нельзя вносить посторонние вещи, продукты.
3. В помещении лаборатории категорически запрещается есть.
4. Перед началом работы обязательно проверяют наличие и исправность приборов, посуды, горелок и др. О замеченных недостатках, неисправностях сообщают преподавателю или лаборанту.

5. Нельзя зажигать одну горелку от другой.
6. Не касаться металлическими и другими предметами проводов и контактных частей электросети. Не включать без ведома преподавателя или лаборанта любую электроаппаратуру.
7. Материал, используемый для учебных занятий, должен рассматриваться как особо опасный.
8. При распаковке материала, присланного для исследования, необходимо соблюдать осторожность - банки с материалом снаружи обтирают ватой, смоченной дезинфицирующим раствором и ставят только на подносы или кюветы.
9. При исследовании поступившего материала и работе с бактериологическими культурами придерживаются правил исключаящих возможность инфицирования работника.
10. Вскрытие трупов лабораторных животных производят в специальной одежде, на соответствующем оборудованном столе с помощью необходимых инструментов, используя для этих целей кювету, залитую воском (или парафином). Инструменты после вскрытия помещают в стакан с дезинфицирующим раствором или обжигают на пламени горелки, на стол класть запрещается.
11. При работе с жидким инфицированным материалом используют резиновые баллоны, соединенные с пипеткой.
12. Жидкости, содержащие патогенных микробов, переливают над сосудом с дезинфицирующим раствором.
13. Если патологический материал попал случайно на стол, его немедленно удаляют тампоном, смоченным дезинфицирующим раствором. При попадании зараженного материала на кожу, конъюнктиву, слизистую ротовой полости принимают экстренные меры к обеззараживанию.
14. По окончании работы использованные культуры микроорганизмов, инструменты и поверхность стола обеззараживают. В конце занятия бактериальные культуры и другой материал студенты сдают преподавателю, а рабочее место приводят в порядок. Перед уходом из лаборатории необходимо, вымыть руки и обработать их спиртом.

Уборка лабораторного помещения

Помещение лаборатории ежедневно до работы убирают влажным способом. Пыль с поверхностей протирают увлажнённой тряпкой смоченной дезинфицирующим раствором. После окончания работы стены, покрытые метлахскими плитками или окрашенные масляной краской, моют горячей водой с мылом или стиральным порошком. Полы моют 3-5% раствором дезинфектанта. Потолки, карнизы, верхняя часть стен, окрашенные клеевой краской, не реже одного раза в неделю очищают от пыли пылесосом.

Подготовка бокса к работе

Ежедневно перед началом работы полы протирают дезинфицирующим веществом (2-5 % раствором хлорамина); воздух обеззараживают бактерицидными лампами, установленными на высоте 2-2,5 м от поверхности пола,

из расчета одна лампа БУВ-30 (1,5-2,5 Вт) на 1м³ помещения. При указанных условиях бокс облучают 2 ч. Перед началом работы лампы выключают. Для того чтобы предотвратить заражение бокса, образцы материалов, подлежащие исследованию, вносят в бокс после предварительного тщательного протирания их 3 % раствором формалина. Работа в боксе проводится в стерильных халатах, защитных масках и тапочках, специально предназначенных для бокса. Воздух в боксе следует регулярно, не менее 2 раз в неделю, проверять на бактериальную контаминацию. Чашки с мясопептонным агаром и средой Сабуро оставляют открытыми на 15 мин. Посев на мясопептонном агаре выдерживают в термостате 48 ч при 37° С, чашки со средой Сабуро - 96 ч при 22° С. Допустимым ростом считается 5 колоний на чашках. Количество колоний больше 5 при 15-минутной экспозиции является показателем высокой контаминации воздуха бокса. В этих случаях помещение бокса нуждается в дополнительной, более тщательной обработке. Не менее одного раза в неделю помещение бокса моют горячей водой с мылом, дезинфицирующими средствами и протирают досуха. По окончании работы берут пинцетом кусок ваты, смачивают его в 5 % растворе хлорамина или формалина и протирают им поверхность стола на рабочем месте.

Устройство биологического микроскопа

Микроскоп - сложный оптический прибор, используемый для изучения морфологии и тинкториальных свойств микроорганизмов.

Принципиально все микроскопы устроены одинаково и состоят из механической части и оптической системы.

Механическую часть составляют:

- основание микроскопа,
- тубусодержатель,
- тубус,
- система винтов для передвижения,
- предметный столик,
- револьвер.

Оптическую часть (рис. 1) составляют:

- окуляр,
- объективы,
- осветительный аппарат.

Работа с иммерсионной системой

Объективы малого увеличения ($\times 3,5$, $\times 8$, $\times 9$) применяют главным образом для предварительного осмотра препарата.

Объективы среднего увеличения ($\times 20$, $\times 40$) применяют для изучения крупных клеток микроорганизмов (например грибов). Эти объективы называются сухими, поскольку при микроскопии между фронтальной линзой и препаратом находится воздух. При этом благодаря различию показателей преломления воздуха ($n=1$) и стекла ($n=1,52$) часть лучей, освещающих препарат, рассеивается и не попадает в объектив.

Объективы больших увеличений ($\times 85$, $\times 90$) носят название иммерсионных. При работе с ними необходима максимальная освещенность препарата; устранение рассеивания, неизбежного при работе с сухими объективами, в данном случае достигается путем использования иммерсионных жидкостей, у которых показатель преломления близок к показателю преломления стекла (рис.2).

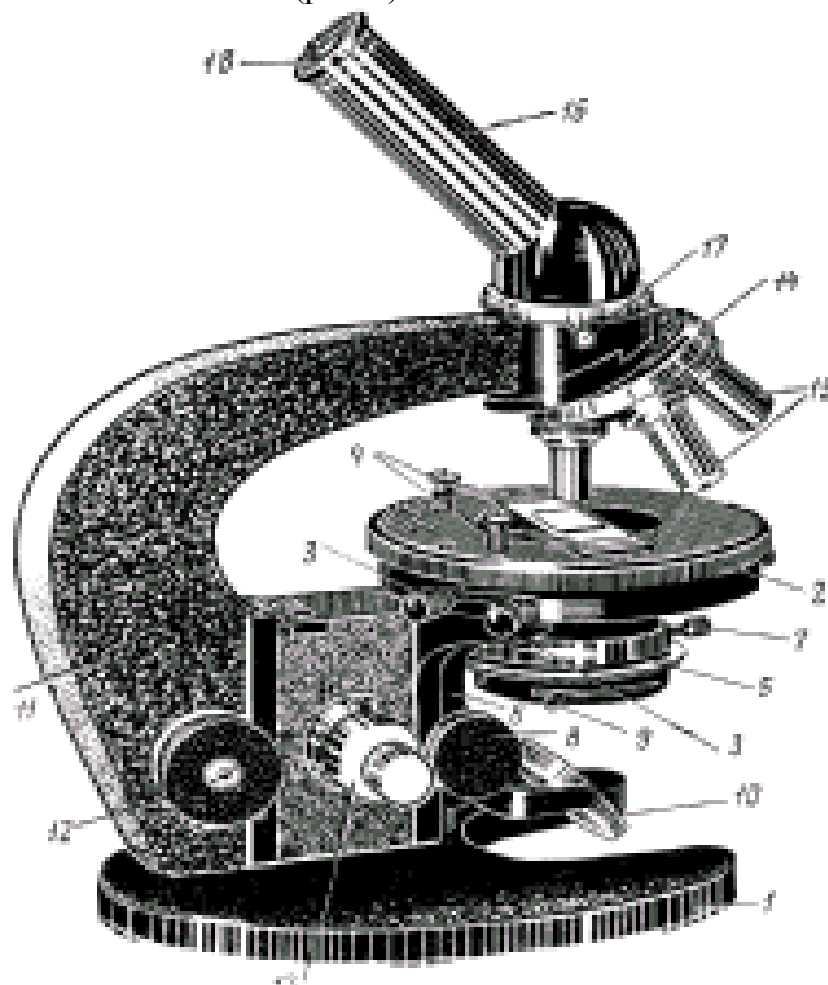


Рис.1. Устройство микроскопа МБР-1. 1-основание; 2-предметный столик; 3-винты для перемещения предметного столика; 4-клеммы; 5-конденсор; 6-кронштейн конденсора; 7-винт, укрепляющий конденсор; 8-рукоятка перемещения конденсора; 9-рукоятка ирисовой диафрагмы конденсора; 10-зеркало; 11-тубусодержатель; 12-рукоятка макрометрического винта; 13-рукоятка микрометрического винта; 14-револьвер; 15-объектив; 16-наклонный тубус; 17-винт для крепления тубуса; 18-окуляр.

Вначале под малым увеличением микроскопа наводят свет и определяют на препарате участок микроскопирования. Затем на выбранное место наносят каплю иммерсии и осторожно (под контролем глаз с боку) погружают в нее фронтальную линзу иммерсионного объектива ($\times 90$). Иммерсионные объективы имеют короткое фокусное расстояние (до 2,3 мм) поэтому наводить на резкость следует путем поднимания объектива, а не опускания его,

так как при небольшом рабочем расстоянии можно раздавить препарат и повредить фронтальную линзу. После грубой наводки, которую проводят с помощью макрометрического винта, руки переводят на микрометрический винт и осуществляют точную фокусировку. По окончании работы объектив поднимают, убирают препарат, а с фронтальной линзы кусочком фильтровальной бумаги убирают иммерсию.

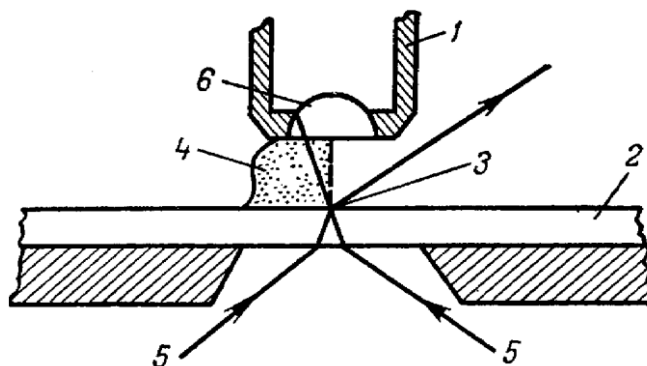


Рис. 2. Схема лучей в иммерсионной системе. 1 - объектив микроскопа; 2 - предметное стекло; 3 - объект исследования; 4 - иммерсионное масло; 5 - лучи света; 6 - фронтальная линза объектива.

Морфология бактерий

По форме бактерий подразделяют на три основные группы: шаровидные (кокки), цилиндрические (палочки) и извитые (рис. 3).

Для различных видов **кокков** характерно своеобразное расположение клеток, обусловленное способом деления.

Микрококки - беспорядочно расположенные кокки, в диаметре не превышают 0,5 мкм.

Диплококки - кокки, располагающиеся попарно, делятся в одной плоскости.

Стрептококки - деление их происходит в одной плоскости и образующиеся клетки не разъединяются, располагаясь цепочками, различной длины.

Тетракокки - сочетание шаровидных микробов по четыре, деление у которых происходит в двух взаимно перпендикулярных плоскостях.

Стафилококки - делятся в различных плоскостях без особой закономерности, образуя беспорядочное скопление клеток, иногда напоминающее грозди винограда.

Сарцины по форме напоминают пакеты или тюки. Образуются в результате деления в трёх взаимно перпендикулярных плоскостях.

Палочковидные микроорганизмы подразделяются на бактерии, бациллы и клостридии.

Бактерии - цилиндрической формы, не образуют спор.

Бациллы - спорообразующие палочки по типу дыхания аэробы, т.е. для своего развития нуждаются в свободном молекулярном кислороде воздуха.

Клостридии - спорообразующие палочки, по типу дыхания анаэробы (не использующие кислород воздуха), диаметр их споры превышает ширину микробной клетки.

Извитые бактерии разделяются на вибрионы, спириллы и спирохеты.

Вибрионы имеют форму запятой, летящей чайки, поворот вокруг оси не превышает четверти оборота.

Спириллы - характеризуются небольшим числом крупных завитков (не более пяти). Передвигаются с помощью жгутиков.

Спирохеты - имеют штопорообразную форму с большим количеством завитков. На конце тела пучком расположены жгутики.

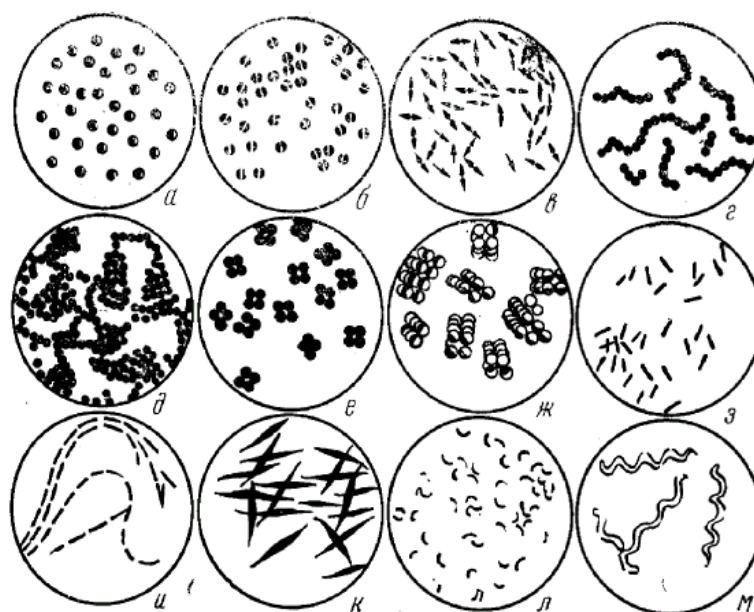


Рис. 3. Основные формы бактерий:

а – микрококки; *б, в* – диплококки; *г* – стрептококки;
д - стафилококки; *е* – тетракокки; *ж* – сарцины;
з, и, к - палочки; *л* – вибрионы; *м* – спириллы.

Задание для выполнения на занятии

1. Записать в тетради правила работы в лаборатории.
2. Законспектировать раздел «Устройство биологического микроскопа» и схематично зарисовать в рабочей тетради биологический микроскоп.
3. Законспектировать раздел «Работа с иммерсионной системой».
4. Зарисовать в рабочей тетради основные формы бактерий.
5. Зарисовать в рабочей тетради основные виды посуды для микробиологических исследований: чашки Петри, плоские бутылки-матрацы, пробирки и колбы с поплавками, колбы конические Эрленмейера, колбы кругло-и плоскодонные, пипетки Мора, пастеровские пипетки, пробирки биологические (без ранта).

Контрольные вопросы

1. Каковы правила работы в бактериологической лаборатории?
2. Опишите методику подготовки к работе микробиологического бокса.
3. Каково устройство светового микроскопа?
4. Опишите работу с иммерсионной системой.
5. Какова морфология бактерий?

Домашнее задание

1. Изучить назначение следующих аппаратов и приборов: термостата, автоклава, сушильного шкафа, центрифуги, лабораторного pH-метра.
2. Подробно изучить и записать в тетради назначение основных составляющих механической и оптической частей биологического микроскопа.
3. Изучить состав и назначение микробиологических питательных сред, порядок приготовления и стерилизации питательных сред. Составить конспект в рабочей тетради.

Лабораторно-практическое занятие № 2

Методы работы с микроорганизмами

Цель занятия. Овладеть методикой приготовления мазка-препарата для микроскопии из микробной взвеси. Ознакомиться с методами приготовления красящих растворов. Отработать методику простого и сложного методов окраски приготовленных препаратов.

Материалы и оборудование. Набор красок, спирт ректификат 96,6%, дистиллированная вода, фильтровальная бумага, предметные стекла, бактериологические петли, пинцеты, пробирки с микробными взвесями, микроскопы. Взвеси бактерий с вакцинным штаммом сибирской язвы, клостридиями, готовые препараты с капсулообразующими бактериями, подвижные бульонные культуры эшерихий 18 часового роста, предметные и покровные стекла, плакаты, 2% раствор сафранина, водный раствор малахитовой зелени, карболовый фуксин Циля.

Методические указания. После объяснений преподавателя студенты конспектируют материал занятия и осваивают нижеизложенные методики, выполняя задания в соответствии с разделом «Задание для выполнения на занятии».

Техника приготовления мазков

Исследуемый материал распределяют тонким слоем по поверхности предметного хорошо обезжиренного стекла.

Мазки готовят из культур микробов, патологического материала (мокрота, гной, моча, кровь и др.) и из органов трупов.

Приготовление препарата для микроскопии складывается из следующих этапов:

1. Приготовление мазка на обезжиренном предметном стекле.
2. Высушивание препарата.
3. Фиксация мазка.
4. Окраска мазка.

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

Техника приготовления мазков определяется характером исследуемого материала.

Приготовление мазков из микробных культур с жидкой питательной среды и из жидкого патологического материала (моча и др.)

Маленькую каплю исследуемой жидкости наносят бактериальной петлей на предметное стекло и круговыми движениями петли распределяют равномерным слоем в виде кружка диаметром в копеечную монету.

Приготовление мазков из крови

На предметное стекло, ближе к одному из его концов, наносят каплю крови. Второе, шлифованное, стекло, которое должно быть уже предметного, ставят на первое под углом 45° , затем подводят к капле крови до соприкосновения с ней. После того как кровь растечется по шлифованному краю, стеклом делают скользящее движение справа налево, равномерно распределяя кровь тонким слоем по всей поверхности стекла. Толщина мазка зависит от величины угла между стеклами: чем острее угол, тем тоньше мазок. Правильно приготовленный мазок имеет светло-розовую окраску и одинаковую толщину на всем протяжении.

Приготовление толстой капли

На середину предметного стекла пастеровской пипеткой наносят каплю крови или прикладывают стекло непосредственно к капле крови, выступающей из пальца. Нанесенную на стекло кровь размазывают бактериальной петлей так, чтобы диаметр образующегося мазка соответствовал величине копеечной монеты. Стекло оставляют в горизонтальном положении до подсыхания крови. Кровь в “толстой капле” распределяется не равномерно, образуя неровный край.

Приготовление мазка из вязкого материала

Материал, нанесенный на предметное стекло ближе к узкому краю, накрывают другим предметным стеклом. Стекла слегка придавливают друг другу. После этого свободные концы стекол захватывают 1 и 2 пальцами обеих рук и разводят в противоположные стороны так, чтобы при движении оба стекла плотно прилегали друг к другу. Получаются мазки с равномерно распределённым материалом, занимающим большую часть.

Приготовление мазка из культур с плотных питательных сред

На середину чистого, хорошо обезжиренного стекла наносят каплю водопроводной воды, в нее вносят бактериальную петлю с небольшим количеством исследуемой микробной культуры так, чтобы капля жидкости стала

слегка мутноватой. После этого излишек микробного материала на петле сжигают в пламени горелки и приступают к приготовлению мазка по описанному выше способу.

Приготовление мазков из органов и тканей

Поверхность органа с целью обеззараживания прижигают накаливаемыми щипцами пинцета, делают по этому месту надрез и из глубины острым концом ножниц вырезают небольшой кусочек ткани, который помещают между двумя предметными стеклами. Далее поступают так же, как при приготовлении мазка из гноя и мокроты. Если ткань органа плотная, то из глубины разреза делают скальпелем соскоб. Полученный при соскабливании материал распределяют тонким слоем по поверхности стекла скальпелем или бактериальной петлей. Для изучения взаимного расположения элементов ткани и находящихся в ней микроорганизмов делают мазки-отпечатки. Для этого вырезанный из середины органа небольшой кусочек ткани захватывают пинцетом и прикладывают поверхностью среза к предметному стеклу несколько раз последовательно, получая, таким образом, ряд мазков-отпечатков.

Высушивание и фиксирование мазков

Приготовленный на предметном стекле мазок высушивают и после высыхания фиксируют. При фиксировании мазок закрепляется на поверхности предметного стекла, и поэтому при последующей окраске препарата микробные клетки не смываются. Кроме того, убитые микробные клетки окрашиваются лучше, чем живые. Различают физический способ фиксации, в основу которого положено воздействие высокой температуры на микробную клетку, и химические способы, предусматривающие применение средств, вызывающих коагуляцию белков

Физический способ фиксации. Предметное стекло с препаратом берут пинцетом или I и II пальцами правой руки за ребра мазком кверху и плавным движением проводят 2-3 раза над верхней частью пламени горелки. Весь процесс фиксации должен занимать не более 2 с. Надежность фиксации проверяют следующим простым приемом: свободную от мазка поверхность предметного стекла прикладывают к тыльной поверхности левой кисти. При правильном фиксировании мазка стекло должно быть горячим, но не вызывать ощущения ожога.

Химический способ фиксации. Для фиксации мазков применяют химические вещества такие как безводный метиловый спирт, этиловый (винный) спирт 96%, жидкость Никифорова (смесь спирта и наркозного эфира в соотношении 1:1), жидкость Карнуа (спирта 96% 60 мл, хлороформа 30 мл, уксусной кислоты ледяной 10 мл)

Предметное стекло с высушенным мазком погружают в склянку с фиксирующим веществом и затем высушивают на воздухе.

Краски, применяемые в микробиологической практике

Для окрашивания микробов используют анилиновые красители (основные, кислые и нейтральные). Микроорганизмы лучше окрашиваются основными красками. Для окраски препаратов готовят спиртовые, водно-

спиртовые и водные растворы. В некоторых случаях добавляют в качестве протравы карболовую кислоту, щелочь и др. Наиболее часто употребляемыми красителями являются следующие:

синие - метиловый синий, водный синий, опаловый синий;

красные - фуксин основной, конго красный, сафранин, нейтральный красный, фуксин кислый;

фиолетовые - метиловый фиолетовый, кристаллический фиолетовый, генцианвиолет;

зеленые - малахитовый зеленый, бриллиантовый зеленый, светло-зеленый;

желто-коричневые - хризоилин, везувин.

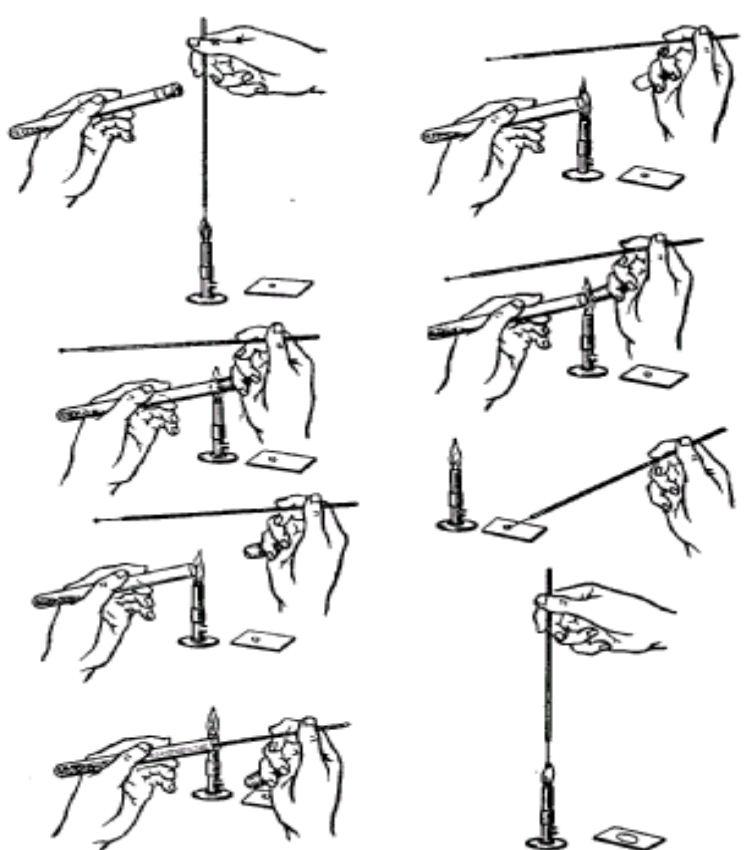


Рис. 4 Схема приготовления препарата-мазка

Техника окраски простым методом

1. При простом методе окраски на фиксированный мазок наливают несколько капель какого-либо спиртоводного или водного раствора красок на 1—2 минуты; чаще всего для этой цели применяется фуксин 1: 10 или леф-флеровская метиленовая синька.

2. Затем краску смывают дистиллированной водой и мазок обсушивают между двумя полосками фильтровальной бумаги. Обычно Фуксином 1: 10 красят 10—30 секунд, а метиленовой синькой – 2-10 мин. Фуксин окрашивает мазки более интенсивно. А при окраске метиленовой синькой получаются нежные, более изящные препараты. Мазок после обсушивания

фильтровальной бумагой должен быть совершенно сухим, в противном случае при соприкосновении оставшейся влаги с кедровым маслом образуется эмульсия и при микроскопии получится неясное изображение. Вообще же продолжительность окраски зависит от вида и качества красящего раствора, степени восприимчивости микроба к окраске и толщины мазка.

При простой окраске микробные тела воспринимают цвет применяемой краски так же интенсивно, как и ядра клеток; в то же время цитоплазма и весь фон мазка (если это не мазок из чистой культуры) окрашиваются в тот же цвет, но несколько бледнее. Фуксин и генцианвиолет относятся к более интенсивно окрашивающим краскам; метиленовая синька окрашивает значительно бледнее. Восприятие окраски зависит не только от свойств красок, но и от свойств подвергаемых окраске микробов. Большинство микробов легко и быстро окрашивается водными или спиртоводными растворами красок.

Для повышения красящей способности воздействуют на краску высокой температурой (нагреванием) до появления паров (вплоть до кипения). Варьируя степень нагревания, можно получать различные степени силы окраски. Удлинение срока воздействия красящего раствора на объект также может в известной мере усилить степень окраски.

Техника окраски сложным методом

Сложные методы окраски основаны на особенностях физико-химического строения микробной клетки. Сущность этих методов заключается в воздействии на мазок двух красящих веществ, из которых одно является основной, главной краской, а другое дополнительной - контраст. После воздействия первой краской мазок обесцвечивают и только после этого подвергают дополнительной окраске. В качестве обесцвечивающих веществ может быть применен целый ряд химических реагентов (кислоты, щелочи, спирт, ацетон и др.). Обмывание мазка простой водой также является в какой-то степени чисто механическим процессом обесцвечивания, но для этого необходимо продолжительное время; кроме того, обесцвечивание получается неполное. По отношению к обесцвечивающим веществам можно разбить микробов на группы легко и трудно обесцвечиваемых. Не все виды микробов одинаково относятся к обесцвечивающим реагентам; некоторые являются кислото- и спиртоустойчивыми, другие только кислотоустойчивы. Наконец, некоторые, как, например, споры, энергично противостоят воздействию всех обесцвечивающих веществ, относятся к группе краскоустойчивых.

Сложные методы окраски имеют важное дифференциально-диагностическое значение для характеристики изучаемого микроба.

Окраска по Граму

1. На фиксированный мазок кладут кусочек фильтровальной бумаги пропитанной 1%-ым спиртовым раствором генцианвиолета. Наносят на бумажку 2-3 капли воды. Окрашивают 2-3 минуты.

2. Бумажку снимают и, не промывая препарата водой, наносят раствор Люголя на 2 минуты.

3. Сливают раствор Люголя и препарат обрабатывают 96%-ным этиловым спиртом в течение 20-30 секунд.

4. Тщательно промывают мазок водой.

5. Окрашивают мазок фуксином Пфейффера в течение 2-3 минут.

6. Препарат промывают водой.

7. Высушивают и микроскопируют.

Грамположительные микроорганизмы окрашиваются в фиолетовый цвет, а грамотрицательные - в розовый.

Этот метод позволяет все микроорганизмы дифференцировать на две группы: грамположительные (гр+) и грамотрицательные (гр-).

Сущность окраски по Граму состоит в том, что отношение к краскам зависит от химического состава клетки и структурных особенностей клеточной стенки (наличие муреина и частично липида). В составе клеточной стенки грамположительных микроорганизмов большое количество муреина, воздействие этиловым спиртом вызывает разбухание муреина, что приводит к уменьшению диаметра пор и снижению проницаемости клеточной стенки. Поэтому не происходит вымывания красителя и обесцвечивания микробной клетки. В клеточной стенке грамотрицательных микроорганизмов муреиновый слой меньших размеров, диаметр пор больше и спирт легко проходит через клеточную стенку, вымывая краситель. Микробная клетка принимает цвет дополнительного красителя (красный). Кроме того, в поверхностном слое грамположительных микроорганизмов находится магниевая соль рибонуклеиновой кислоты, которая в присутствии йода в кислой среде образует прочное соединение с основными красителями. Это так же препятствует обесцвечиванию их спиртом.

Пример: *Escherichia coli* (кишечная палочка) и *Salmonella cholerae suis* (возбудитель сальмонеллеза свиней) - грамотрицательные и окрашиваются в розово-красный цвет. *Listeria monocitogenes* (возбудитель листериоза), *Streptococcus equi* (возбудитель мыта) - грамположительные и окрашиваются генцианвиолетом в фиолетовый цвет.

Окраска кислотоустойчивых микроорганизмов

В природе существует группа микроорганизмов, устойчивых к действию кислот, щелочей и спиртов. Они относятся к роду *Mycobacterium* (возбудители туберкулеза, паратуберкулеза крупного рогатого скота, проказы человека). Химическая структура цитоплазмы и клеточной оболочки микроорганизмов данной группы отличается содержанием значительного количества жировосковых веществ, в частности стеариновых кислот (в том числе фтионовой кислоты до 40%), поэтому проникновение красителя в клетку затруднено. Для их окраски используют протравливание (нагревание мазка с красителем над пламенем). Окрасившись, они прочно удерживают краску и не обесцвечиваются кратковременным действием кислоты.

Окраска по Циль-Нильсену

1. Фиксированный на пламени мазок покрывают полоской фильтровальной бумаги, наливают на нее карболовый раствор фуксина и подогревают; при появлении паров прекращают нагревание и оставляют краску на препарате еще на несколько минут (2-3 минуты). Дав препарату остыть, удаляют пинцетом бумажку и обмывают мазок водой.

2. Обесцвечивают препарат 5-10 % водным раствором серной кислоты в течение 3-5 секунд (до желтоватого оттенка мазка). Вместо серной кислоты можно применить 5 % раствор азотной или 3 % раствор соляной кислоты.

3. Мазок тщательно промывают водой.

4. Споласкивают 96° спиртом.

5. Снова промывают водой.

6. Докрашивают в течение 3-5 минут леффлеровской метиленовой синькой или водным раствором 1: 1000 малахитовой зелени или метиловой зелени.

7. Краску смывают водой и препарат высушивают.

Микроскопическая картина: туберкулезные палочки - рубиново красные, остальные, за исключением возбудителя паратуберкулеза, кислото- и спиртоустойчивых сапрофитов, - синие.

Для обесцвечивания мазков при окраске по Циль-Нильсену вместо растворов кислот и спирта особо рекомендуется применение солянокислого алкоголя (соляной кислоты - 3 мл + 96° спирта - 97 мл) до слабо заметного розоватого оттенка препарата. После этого мазок ополаскивают водой и докрашивают метиленовой синькой и т. д. по основной прописи. Указанным методом достигается одновременное испытание бацилл на кислото- и спиртоустойчивость. Среди видов кислотоустойчивых сапрофитов встречаются спиртоподатливые разновидности, палочки же туберкулеза и паратуберкулеза всегда кислото- и спиртоустойчивы.

Окраска спор

При неблагоприятных условиях для микробов (отсутствие питательной среды, высушивание, неблагоприятная температура и др.) в цитоплазме некоторых микроорганизмов образуются споры. Формируются они внутри вегетативной клетки, являясь эндоспорами. Палочковидные грамположительные микроорганизмы, образующие округлые споры, диаметр которых не превышает ширину микробной клетки, относятся к роду *Bacillus* и называются бациллами. Микроорганизмы рода *Clostridium* имеют споры диаметр которых превышает ширину микробной клетки и называются клостридиями. По форме они бывают овальные и круглые (рис. 5).

Споры устойчивы к воздействию высоких температур, химических веществ, к высушиванию, длительно сохраняются в почве, что объясняется их особым строением и химическим составом, в особенности ее оболочки. Поэтому споры стойки к действию красителей.

Все методы окраски спор основаны на обеспечении проникновения красителя через трудноокрашиваемую оболочку споры. Поэтому применяют протраву. После охлаждения оболочка вновь становится плотной и не пропускает дополнительный краситель.

Техника окраски спор методом Трүхильо

1. На фиксированный мазок накладывают небольшой кусочек фильтровальной бумаги и на нее наносят водный раствор малахитовой зелени.

2. Подогревают препарат на пламени горелки до появления паров и выдерживают в течение 3 минут

3. Промывают дистиллированной водой.

4. Докрашивают 0,25%-ным водным раствором основного фуксина 1 минуту.

5. Промывают водой и высушивают.

Микрокартина: споры зеленые, а вегетативные клетки красные.

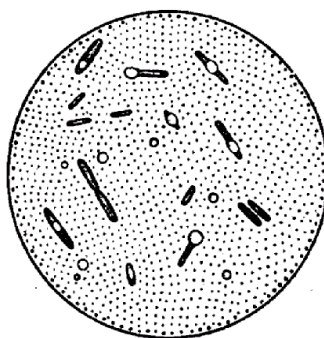


Рис. 4. Споры микроорганизмов различных типов

Окраска капсул

Тело микробной клетки покрыто рыхлым слизистым слоем. У некоторых видов микроорганизмов этот слой развивается очень сильно и тогда он называется капсулой. *Капсула - муциноподобное вещество, высокомолекулярный полисахарид, является производным наружного слоя оболочки.* Наличие капсулы является важным диагностическим признаком при идентификации и дифференциации возбудителей некоторых инфекций (сибирской язвы, пневмококковой пневмонии и др.) (рис. 5). Патогенные микроорганизмы образуют капсулу в инфицированном организме. Она является фактором вирулентности и защищает бактериальную клетку от фагоцитоза и бактерицидного действия сыворотки крови. Капсульное вещество плохо окрашивается. Поэтому при приготовлении препарата для обнаружения капсулы выполняют следующие правила:

а) мазок готовят из свежего материала, так как капсула быстро лизируется;

б) фиксируют мазок химическим способом, для окраски применяют метохромотические краски, то есть при использовании которых цитоплазма окрашивается в один цвет, а капсула - в другой;

в) промывать мазок водой следует слабо и кратковременно.

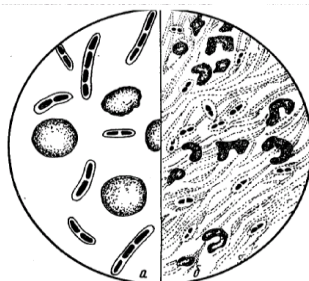


Рис.5.Капсула у бактерий: а - *бацилла сибирской язвы*; б – *диплококк*

Техника окраска капсул по методу Ольта

1. Свежий горячий 2%-ный раствор сафранина наносят на фиксированный мазок, окрашивают 5-7 минут.

2. Быстро промывают водой и высушивают.

Тело клетки окрашивается в красно-кирпичный цвет, капсула в - желто-оранжевый.

Определение подвижности бактерий

Подвижности бактерий важный видовой признак и производится при диагностических исследованиях: результат учитывают при идентификации микроорганизмов. У подвижных видов способность самостоятельного поступательного (и вращательного) движения обусловлена наличием *жгутиков* - специальных тонких нитевидных образований. Жгутики бывают различной длины. Их диаметр настолько мал, что они невидимы в световом микроскопе (менее 0,2 мкм). У разных групп бактерий количество и расположение жгутиков неодинаково. Жгутики плохо воспринимают красители. Методы сложной окраски искажают подлинный вид жгутиков, поэтому в лабораториях окраску жгутиков не осуществляют, а исследуют бактерии в живом состоянии.

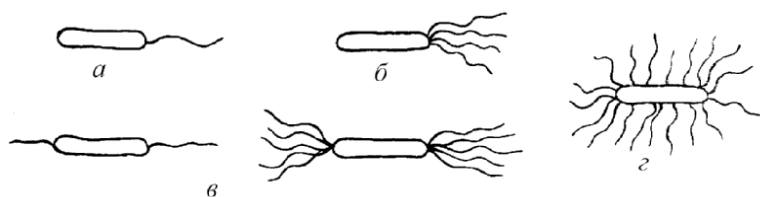


Рис. 6. Типы расположения жгутиков у бактерий

В зависимости от расположения и количества жгутиков микробы подразделяют (рис. 7):

а) *монотрихи* - микроорганизмы имеющие на одном из полюсов один жгутик, движения активные, поступательные (псевдомонас);

б) *лофотрихи* - микробы имеющие на одном из полюсов пучок жгутиков (листерии);

в) *амфитрихи* - микробы, имеющие жгутики на обоих полюсах микробной клетки;

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

Есть виды микроорганизмов, обладающие подвижностью, но жгутиков не имеют (спирохеты, лептоспиры). Их движение обусловлено импульсивными сокращениями двигательного фибриллярного аппарата микробной клетки.

Для определения подвижности у бактерий необходимо использовать культуру не старше суточного возраста, так как старые культуры утрачивают способность передвигаться.

Определение подвижности микроорганизмов

Определение подвижности бактерий методом «висячая капля»

Каплю молодой (18-20 часовой) бульонной культуры бактерий бактериологической петлей наносят на покровное стекло. Специальным предметным стеклом с углублением (луночкой) накрывают каплю культуры так, чтобы покровное стекло с каплей находилось в центре луночки и прилипло к предметному стеклу (края луночки предварительно слегка смазывают вазелином). Препарат перевертывают стеклом вверх, и капля «повисает» над луночкой (рис. 8). Препарат микроскопируют при затемненном поле зрения, сначала при малом, затем при среднем или большом увеличении. На светлом фоне микробы темно-серые.

Определение подвижности бактерий методом Шукевича

Для этого каплю микробной взвеси наносят в конденсат скошенной плотной питательной среды в пробирке. Подвижные микроорганизмы, передвигаясь из конденсата, растут на поверхности среды; неподвижные виды размножаются только в конденсате среды («не заходя» на поверхность агар).

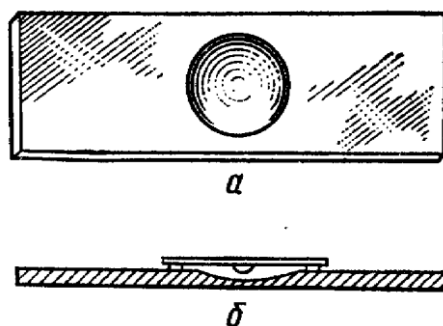


Рис. 7. Исследование микробов на подвижность *а* - стекло с луночкой; *б* - «висячая капля».

Определение подвижности бактерий методом «раздавленная капля»

Каплю бактериальной взвеси наносят на обычное предметное стекло, осторожно накрывают покровным стеклом и слегка придавливают пальцем. Микроскопию проводят так же как и в методе «висячая капля».

Определение подвижности бактерий **методом посева уколом в полужидкий агар**

Для этого бактериологической петлей производят посев исследуемой культуры уколом до дна пробирки с полужидкой питательной средой. Подвижная культура растет по всей питательной среде, образуя равномерное помутнение, а неподвижная - только по уколу в виде стержня, сохраняя прозрачность незасеянного участка среды.

Задание для выполнения на занятии

1. Законспектировать раздел «Техника приготовления мазков» в рабочей тетради.
2. Законспектировать раздел «Высушивание и фиксирование мазков» в рабочей тетради.
3. Законспектировать раздел «Техника окраски простым методом» в рабочей тетради. Приготовить из предложенных культур микроорганизмов мазок и окрасить простым методом окраски микроорганизмов. Увиденную в поле микроскопа картину зарисовать в рабочей тетради, используя цветные карандаши.
4. Законспектировать раздел «Техника окраски сложными методами» в рабочей тетради. Приготовить мазки из предложенных культур и окрасить и окрасить их по Граму, по Цилю-Нильсену, по Трухильо и по Ольту. Увиденную в поле микроскопа картину зарисовать в рабочей тетради, используя цветные карандаши.
5. Законспектировать раздел «Определение подвижности бактерий» в рабочей тетради. Зарисовать в рабочей тетради типы расположения жгутиков у бактерий. Освоить методики определения подвижности микроорганизмов.

Контрольные вопросы

1. Какова техника приготовления мазков из различного исследуемого материала?
2. Опишите методику «Техника окраски простым методом».
3. Каковы методики окраски микроорганизмов сложными методами окраски?
4. В чем сущность окраски по Граму?
5. Как определяют подвижность микроорганизмов?

Домашнее задание

1. Изучить порядок проведения посева и пересева микроорганизмов. Сделать конспект в рабочей тетради.
2. Подробно изучить и записать в тетради методы получения накопительных культур. Зарисовать в тетради рис.9.
3. Внимательно изучить и записать в тетради методы выделения чистых культур культур.

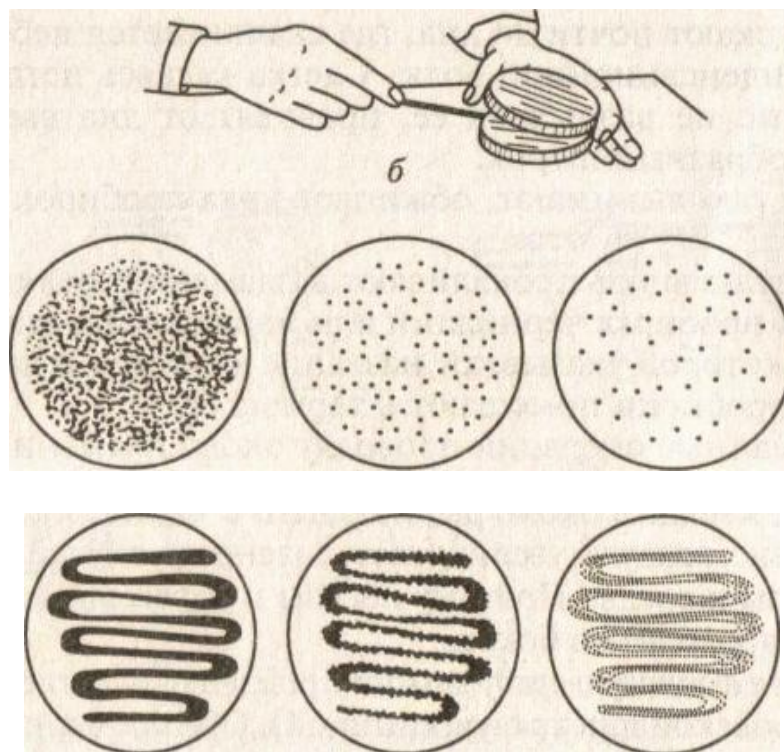


Рис. 9. Посев микроорганизмов на поверхность плотной среды в чашках Петри: *а* - шпатель Дригальского; *б* - положение чашки и рук при посеве шпателем; *в* - рост микроорганизмов после посева шпателем; *г* - рост микроорганизмов после посева петлей

Лабораторно-практическое занятие №3

Изучение морфологии бактерий

Цель занятия. Изучить и описать колонии бактерий, выросших на агаризованной среде, величину, край профиль колоний; приготовить препараты бактерий, определить форму клеток, подвижность, наличие спор; пересеять изучаемые культуры на скошенный агар в пробирку.

Материалы и оборудование. Микроскопы биологические, спиртовки, предметные стекла, бактериальные петли, фуксин Циля, капельница с водой. Чашки Петри с колониями бактерий, пробирки с МПА по 10 мл (скошенный агар).

Методические указания. После объяснений преподавателя студенты конспектируют материал занятия и осваивают нижеизложенные методики, выполняя задания в соответствии с разделом «Задание для выполнения на занятии».

Термин «бактерии» происходит от лат. *bacterion* - палка, палочка. Бактерии относятся к прокариотным организмам. Это одноклеточные организмы.

Размножение клеток осуществляется путем их роста и деления (обычно пополам, иногда на неравные части).

Клетки после деления могут оставаться соединенными, в результате чего возникают характерные группировки. Многие виды обладают жгутиками бактериального типа и в жидкой среде способны активно плавать; другим свойственно скользящее, сократительное, «щелкающее» или кувыркающееся движение на поверхности твердых сред. У одних видов образуются эндоспоры.

Клетки находятся внутри жесткой или полужесткой клеточной стенки, обеспечивающей постоянство формы.

Генофор бактерий состоит из нуклеоплазмы, которая не отделена от цитоплазмы ядерной мембраной.

В настоящее время принята классификация бактерий, утвержденная юридической комиссией Международного союза микробиологических обществ, представленная в Кратком определителе бактерий Берги. Царство *Procaryotae*, к которому относятся бактерии, состоит из двух отделов: первый - фототрофные прокариоты («фотобактерии»), которые здесь не рассматриваются, и второй - прокариоты, индифферентные к свету («скотобактерии»).

Методика выполнения лабораторной работы

1. Изучить и описать колонии бактерий, выращенных на плотной питательной среде в чашках Петри; результаты представить в табл. 1

- размер (диаметр) измеряют линейкой в миллиметрах: мельчайшие, точечные, крупноточечные - менее 1 мм;
- цвет колоний и субстрата под колониями (от белого до черного);
- форма - бывает круглая, овальная и т.д.
- край - при необходимости устанавливают с помощью лупы (рис. 10);
- поверхность - бывает гладкая, зернистая, морщинистая, концентрически или радиально исчерченная, бугристая, мучнистая, матовая, блестящая, влажная, сухая и др.;
- прозрачность - бывает прозрачная, полупрозрачная, непрозрачная;
- структура колонии - бывает однородная, мелкозернистая, волокнистая и др.;
- профиль - бывает изогнутый, каплевидный, плоский, выпуклый, вогнутый;
- консистенция (определяют при касании поверхности колонии бактериальной петлей) - бывает плотная, мягкая, тягучая, тестообразная и др.

На рис. 11 представлены фотографии различных бактериальных колоний

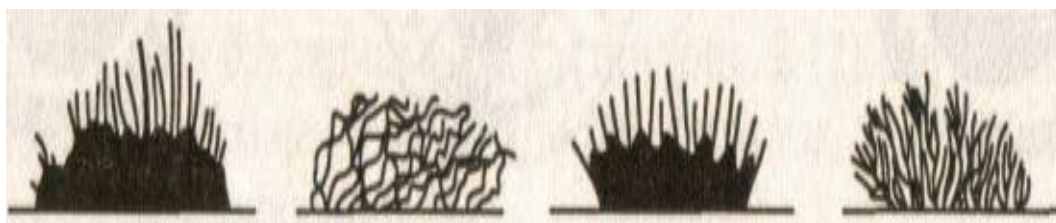


Рис 10. Края колоний

Колонии, различающиеся хотя бы одним из внешних признаков, следует рассматривать как разные типы. Каждый вид бактерий имеет вполне определенный тип колонии, поэтому по числу типов колоний в чашках Петри можно ориентировочно судить о разнообразии видового состава бактериальной флоры исследуемого пищевого продукта.

2. Определить форму бактерий пяти колоний и спорообразование клеток. Приготовить препараты бактерий, провести простую окраску и их микроскопическое исследование. Результаты записать в табл. 2 и схематично зарисовать.

На рис. 12 представлены фотографии цикла развития бактерий от споры до споры.

3. Определить подвижность бактерий. Приготовить препарат «висячая капля».

Движение бактериальных клеток лучше наблюдать в препарате «висячая капля», используя молодые бульонные или агаровые культуры в возрасте 6-12 ч, но не старше суточных. При наблюдении под микроскопом в поле с разной скоростью. В отличие от самостоятельного движения клеток броуновское движение взвешенных частиц и неподвижных клеток характеризуется зрени хорошо видно активное перемещение клеток в разных направлениях беспорядочными колебаниями на одном месте. Результаты записать в табл. 2.

4. Посеять культуры бактерий на скошенный агар. Сделать пересев культур бактерий со среды на чашках Петри в пробирки со скошенным агаром. Посевы поставить в термостат при температуре 30 °C на 24 ч.

Таблица 1

Культуральные признаки колоний бактерий

Описываемые признаки колоний	Номер колонии				
	1	2	3	4	5
Цвет					
Форма					
Край					
Поверхность					
Прозрачность					
Структура					
Профиль					
Консистенция					
Размер					

Таблица 2

Форма клеток, образование спор и подвижность

Номер ко-	Форма кле-	Взаимное	Спорообразование	Подвижность
-----------	------------	----------	------------------	-------------

лонии	ток	расположение клеток		

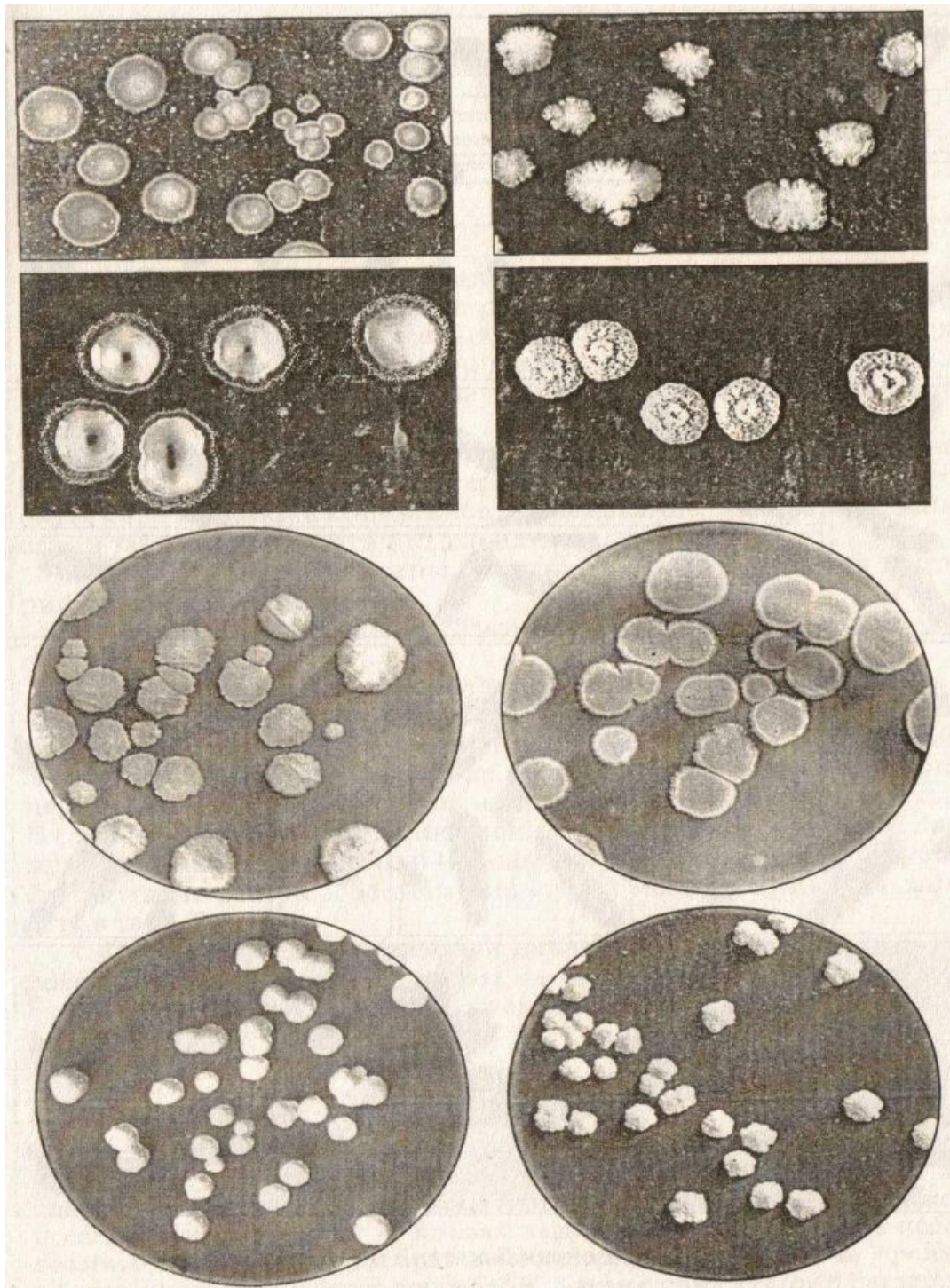


Рис 11. Колонии бактерий (фотографии)

Задание для выполнения на занятии

1. Законспектировать материал занятия.

2. Выполнить лабораторную работу в соответствии с методикой, зарисовывая рисунки и заполняя таблицы.

Контрольные вопросы

1. Какие существуют методы исследования морфологии бактерий?
2. Какие существуют способы фиксации бактериальных препаратов?
3. Каковы преимущества и недостатки прижизненного микроскопического исследования микробов?
4. Каковы задачи микроскопического исследования окрашенных препаратов микроорганизмов? Каковы преимущества и недостатки этого способа?
5. Какая форма клеток у бактерий?
6. Какие группировки клеток бывают у шаровидных бактерий и как они называются?
7. Какие бактерии образуют споры?
8. Каково значение спор у бактерий?
9. Какими свойствами обладают споры?
10. За счет чего бактерии активно двигаются?
11. Как называются бактерии с разным числом жгутиков?

Домашнее задание

1. Самостоятельно изучить культуральные и морфологические признаки дрожжей. Законспектировать материал в рабочей тетради и сделать рисунок «Морфология дрожжей».



Рис 12. Цикл развития бактерий от споры до споры
Лабораторно-практическое занятие № 4

Изучение морфологии плесневых грибов.
Идентификация грибов до рода

Цель работы: изучить и описать культуральные признаки плесневых грибов, изучить морфологические признаки плесневых грибов, определить род плесневых грибов, используя ключ Никитинского - Алеева.

Оборудование инструменты: чашки Петри с колониями плесневых грибов, предметные и покровные стекла, препаровальные иглы, спирт с глицерином (1:1), красители, лупы, биологический микроскоп.

Методические указания. После объяснений преподавателя студенты конспектируют материал занятия и осваивают нижеизложенные методики, выполняя задания в соответствии с разделом «Задание для выполнения на занятии».

Грибы - обширная группа эукариотных организмов, включает в себя около 100 тыс. видов, разделенных на шесть классов: хитридиомицеты, оомицеты, зигомицеты, аскомицеты, базидиомицеты, дейтеромицеты.

Грибы - это самостоятельное царство эукариотных организмов, характеризующееся следующими признаками: образование хорошо выраженной клеточной стенки, абсорбтивное питание, размножение спорами, неподвижность в вегетативном состоянии и неограниченный рост, первично гетеротрофный способ питания, накопление в качестве запасного продукта гликогена.

Вегетативное тело грибов представляет собой мицелий, состоящий из ветвящихся гиф с верхушечным ростом и боковым ветвлением. Мицелий пронизывает субстрат и всей поверхностью поглощает из него питательные вещества - субстратный мицелий. Мицелий также располагается на поверхности субстрата и образует поверхностный и воздушный мицелий.

На воздушном мицелии обычно образуются органы размножения. Мицелий грибов бывает одноклеточный (несептированный) и многоклеточный (септированный).

Одноклеточный, или несептированный, лишенный поперечных перегородок мицелий, представляет собой одну гигантскую клетку с большим числом ядер (рис. 13, а).

Многоклеточный, или септированный мицелий, разделенный перегородками - септами на отдельные клетки, содержащие от одного до нескольких ядер (рис. 13,б).

Представители грибов классов хитридиомицетов, оомицетов, зигомицетов имеют неклеточный мицелий.

Представители грибов классов аскомицетов, базидиомицетов и дейтеромицетов состоят из клеточного мицелия с настоящими септами.

Грибы прекрасно развиваются на пищевых продуктах, промышленных материалах и изделиях, бумаге, произведениях искусства в музеях, вызывая их порчу и разрушение. Многие грибы образуют микотоксины и вызывают пищевые отравления.

Грибы поражают культурные растения, нанося большой вред сельскому хозяйству. Есть патогенные грибы.

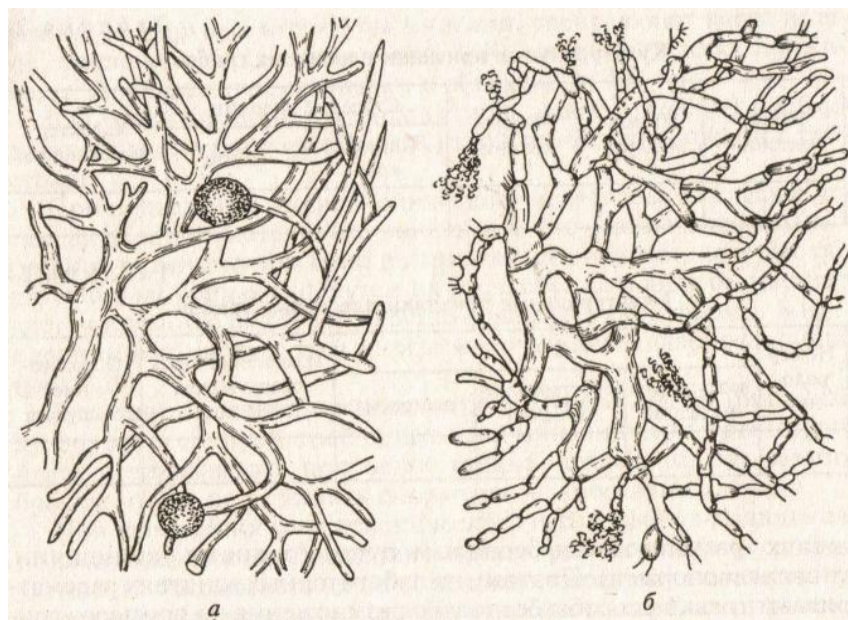


Рис. 13. Гифы грибов: а- несептированные, б - септированные

Методика выполнения лабораторной работы

1. Изучить культуральные признаки плесневых грибов. Большинство плесневых грибов, развиваясь на предметах окружающей среды пищевых продуктах, размножаются бесполым путем (оидиями, конидиями, спорангиоспорами). Поэтому на лабораторных занятиях рассматривают только способы бесполого размножения на примерах грибов - возбудителей порчи пищевых продуктов. Культуры этих грибов выращивают в чашках Петри на плотной питательной среде. Культуры в чашках не следует без надобности держать открытыми, так как споры грибов легко осыпаются и рассеиваются, что может привести к нежелательному заражению плесневыми грибами лаборатории, изучаемых культур и людей.

При изучении отмечают: размер колоний, их форму, плотность, строение наружного края и центра, характер поверхности, цвет колоний, окраску субстрата и обратной стороны колоний, выделение капель жидкости (экссудата). На плотных средах мицелиальные грибы образуют округлые или широко распространенные по поверхности, не врастающие в субстрат, пушистые, нитевидные, паутинообразные, ватоподобные или мучнистоподобные колонии. Вегетативный мицелий большинства видов не окрашен. Пигментирован только плодоносящий мицелий. Поэтому молодые колонии имеют белый или сероватый цвет. По мере развития органов плодоношения колонии приобретают желтый, розовый, бежевый, красный, зеленый, черный или другой цвет.

Результаты записывают в табл. 3 и 4.

Таблица 3

Культуральные признаки плесневых грибов

Номер колонии	Размер коло-	Форма коло-	Строение колонии		Характер поверхности
			Наружный край	Центр	

Таблица 4

Культуральные признаки плесневых грибов

Номер колонии	Цвет			Изменение цвета среды вокруг колонии	Образование экссудата
	воздушного мицелия	субстратного мицелия	реверзума		

2. Изучение морфологических признаков плесневых грибов. Приготовление препаратов грибов для микроскопирования производят двумя обожженными и затем охлажденными препаровальными иглами. Отбирают небольшой кусочек мицелия вместе с плодоносящими гифами. Переносят его на хорошо обезжиренное предметное стекло в каплю смеси глицерина и этанола (1:1). Осторожно, не нарушая структуры мицелия, расправляют гифы иглами, после чего накрывают покровным стеклом и слегка прижимают. Препарат просматривают с объективом 40.

Для приготовления препарата гриба оидиум (*Oidium*) необходимо снять (слегка соскабливая) иглой его белый мицелий с субстрата.

При проведении микроскопического исследования следует установить многоклеточность мицелия и отсутствие специальных органов размножения. Гриб размножается оидиями, которые образуются на концах гиф путем их расчленения в виде бесцветных клеток прямоугольной или округло-прямоугольной формы. В препарате могут наблюдаться иногда цепочки нераспавшихся оидий (рис. 14).

Для приготовления препарата гриба мукор (*Mucor*) (рис. 15) нужно взять его пушистый воздушный мицелий черновато-серого цвета и накладывать покровное стекло осторожно, без резкого броска, чтобы не раздавить спорангии — вместилища спор.

При проведении микроскопического исследования выявить одноклеточное строение мицелия и органы размножения - спорангиеносцы. Рассмотреть их по всей длине, передвигая соответствующим образом препарат. Спорангиеносцы мукора, как правило, простые, неветвящиеся, отрастают от грибницы одиночно. Спорангии, сидящие на их верхушках (колонках), крупные, шарообразные, с массой спор, которые видны через тонкую прозрачную оболочку спорангия. Спорангиоспоры - одноклеточные, округлые или эллипсоидальные, гладкие, бесцветные или сероватого цвета. В препарате всегда есть много свободно лежащих спор, выпавших из некоторых лопнувших спорангиев.

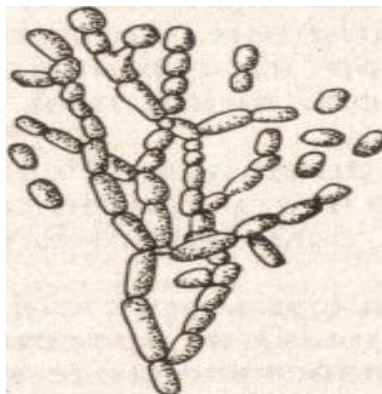


Рис. 14. *Oidium* с оидиоспорами

К мукоровым грибам относятся ризопус (*Rhizopus*) (рис. 16), который отличается от мукора образованием так называемых ризоидов и столонов, которые служат для захвата новой площади.

Для приготовления препарата гриба аспергиллус (*Aspergillus*) необходимо взять воздушный окрашенный мицелий с края колонии.

При микроскопическом исследовании найти многоклеточные гифы и органы размножения - конидиеносцы. Конидиеносец по внешнему виду простой, одноклеточный, неветвящийся. На его конце имеется булабовидное вздутие, на котором расположены в один ярус бутылочковидные клетки стеригмы, а на них одноклеточные споры в виде цепочек - конидии. Верхушка конидиеносца с массой неосыпавшихся спор кажется плотной, плохо просвечивается, ее можно рассмотреть лишь при осыпании спор (рис. 17).

Для приготовления препарата гриба пенициллиум (*Penicillium*) рекомендуется брать более молодую, зеленую часть грибницы, расположенную на границе с белым ее краем, заметно внедряясь в нее препаровальными иглами.

При микроскопическом исследовании найти многоклеточные гифы и органы размножения - конидиеносцы. Они представляют собой многоклеточные гифы, кистевидно разветвленные на концах. На концах ветвей расположены стеригмы (по 2 - 4), а на стеригмах - цепочки одноклеточных конидий, имеющих голубовато-зеленую окраску с различными оттенками (рис. 18) Для приготовления препарата гриба ботритис (*Botritis*) следует взять небольшой кусочек воздушной пушистой грибницы. На кладывать покровное стекло надо очень осторожно, чтобы не разрушить конидиеносцы, с которых легко осыпаются конидии.

При микроскопическом исследовании выявить древовидно разветвленный конидиеносец, на концах ветвей которого кучками располагаются конидии - одно-клеточные, сероватого цвета, овальной формы (рис. 19).

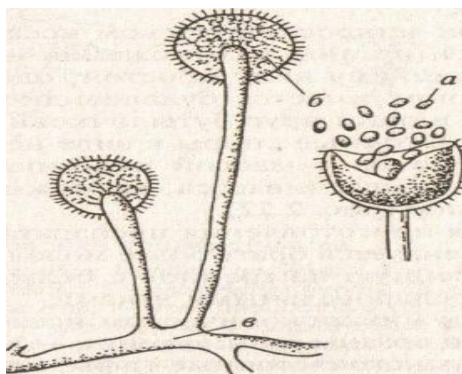


Рис. 15. *Mucor*:
а - спорангиоспоры; б – спорангий; в – гифа

Для приготовления препарата гриба адьтернария (*Alternaria*) необходимо взять грибницу в ее черных участках, заметно внедряясь иглами в глубь грибницы.

При микроскопическом исследовании найти многоклеточный мицелий и крупные многоклеточные темноокрашенные конидии округло-грушевидной или заостренно-вытянутой формы. Обратит внимание на то, что конидиеносцы-гифы, на которых находятся конидии, слабо развиты и мало отличаются от других вегетативных гиф (чаще они слегка пигментированы - серого или бурого цвета). Конидии образуются на таких конидиеносцах поодиночке или короткими цепочками. Конидии альтернрии часто септированные.

При изучении отдельных возбудителей плесневения пищевых продуктов и промышленных товаров необходимо уметь распознавать их, т. е. установить название, принадлежность к тому или иному классу, семейству, роду, виду.

Товароведы пищевых продуктов и непродовольственных товаров чаще всего оперируют названием рода гриба.

Род гриба определяется по ключу Никитинского-Алеева.

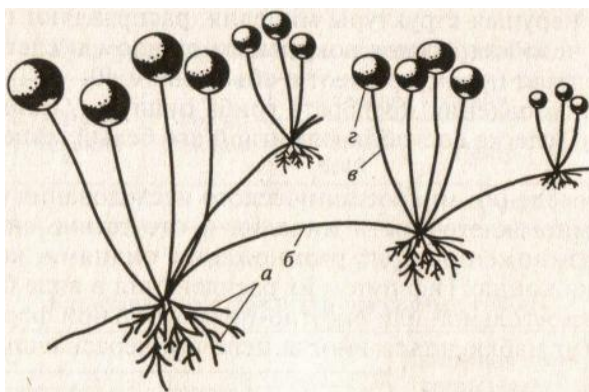


Рис. 16. *Rhizopus*:

a – ризоиды; *b* – столон; *в* – спорангиеносец; *г* – спорангий

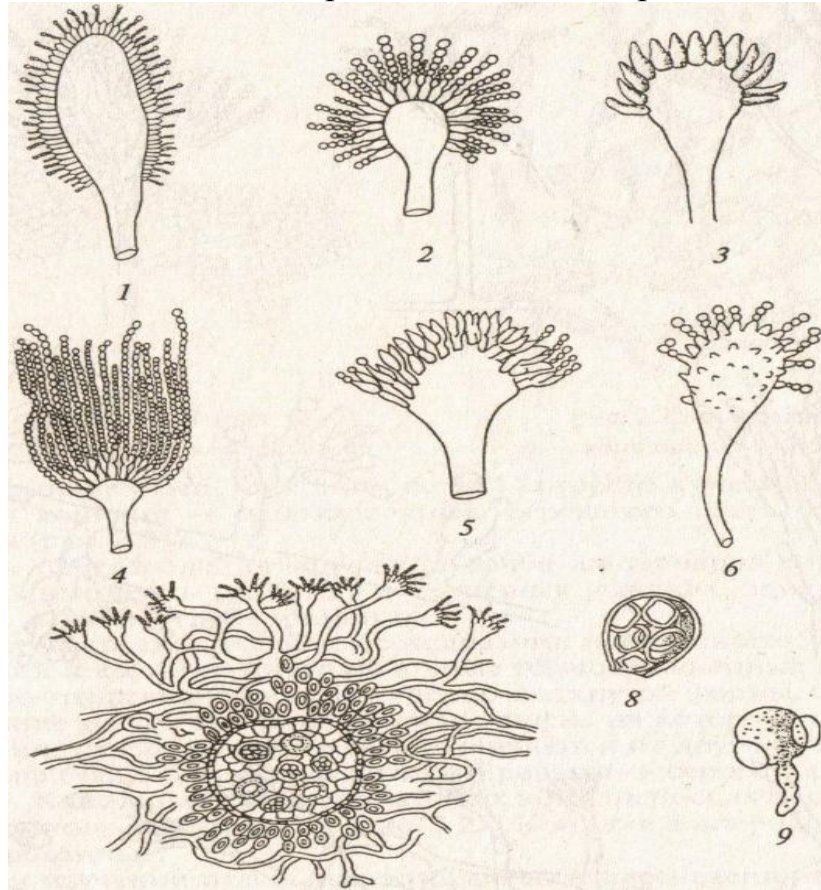


Рис. 17. *Aspergillus*. Головки конидиеносцев: 1-6; 7 – дерновинка конидиеносцев и под ней клестокарпий, окруженный оберткой из толстостенных клеток; 8 – сумка со спорами; 9 – прорастание аскоспоры

Ключ для определения рода плесневого гриба

1. Грибы размножаются спорангиоспорами, находящимися внутри спорангиев.

2. Грибы размножаются конидиями, образующимися снаружи на особых конидиеносцах, реже - прямо на мицелии Спорангиеносцы, несущие спорангии, обычно простые, реже просто ветвящиеся. Спорангии все одинаковые.

Спорангиеносцы ветвящиеся. Спорангии двух видов: крупные на главной оси и мелкие (спорангиоли) на боковых ветвях.

3. Спорангиеносцы одиночные, простые, иногда ветвящиеся. Спорангии мелкие или крупные, всегда однородные, бесцветные или окрашенные. Споры круглые или эллипсоидальные, гладкие, бесцветные или серого цвета (мукор (*Mucor*)) (см. рис. 15).

Спорангиеносцы расположены кустиками, вырастающими на столонах из одного центра, с большими черными головками. Споры серого цвета, округло-яйцевидные, морщинистые. Ризопус (*Rhizopus*) (см. рис. 16).

4. Кустовидные ветви расположены мутавчато на главной оси спорангиеносца в один или несколько ярусов. Места ответвления не раздуты. Споры ци-

линдрические и эллипсоидальные, бесцветные (тамнидиум (*Thamnidium*)) (рис. 20).

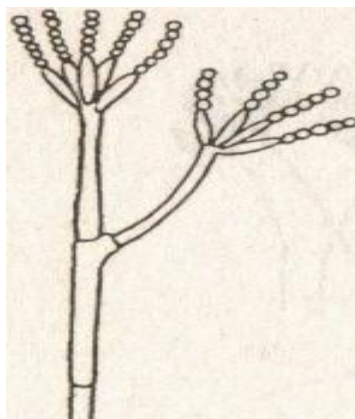


Рис. 18. *Penicillium*. Одномутовчатое строение кониеносцев

5. Конидии образуются на особых конидиеносцах, отличных от обыкновенных вегетативных гиф.

Конидиеносцы или мало отличаются от обыкновенных гиф, или их нет вовсе, и конидии образуются прямо на мицелии.

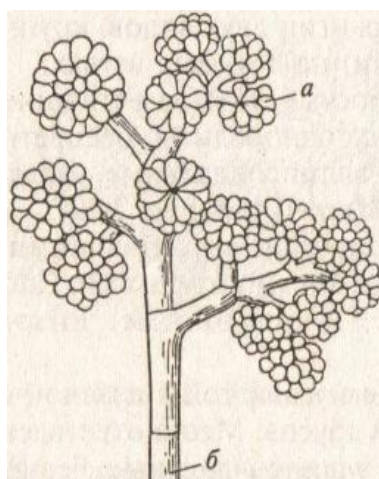


Рис. 19. *Botritis*: *a* – конидии; *б* - конидиеносцев

6. Конидиеносцы обильно ветвятся различным образом. Конидиеносцы не ветвятся или иногда ветвятся, но слабо. Ветвление простое, вильчатое или кустообразное.

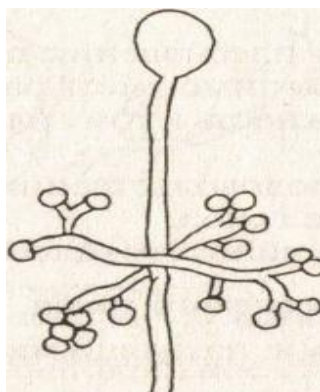


Рис. 20. *Thamnidium*

7. Ветвление древовидное. Ветвление кистевидное или многократно вильчатое, конидии располагаются цепочками, гладкие, бесцветные или окрашенные, округлые (пенициллиум (*Penicillium*)) (см. рис. 18).

8. Конидиеносцы древовидно разветвленные, большие. Ветви располагаются беспорядочно, конидии на концах ветвей развиваются кустиками, бесцветные, яйцевидные, гладкие (ботритис (*Botritis*)) (см. рис.19).

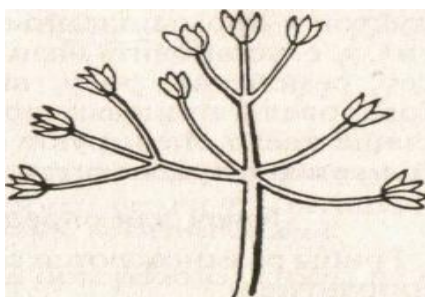


Рис. 21. *Verticillium*

Конидиеносцы древовидно разветвленные. Ветви располагаются мутовчато. Конидии образуются пучками или поодиночке, эллипсоидальные или вытянуто-яйцевидные, бесцветные или слабоокрашенные (вертициллиум (*Verticillium*)) (рис. 21).

9. Конидиеносцы неветвящиеся, длинные, с кустиками больших грушевидных конидий на конце. Конидии двухклеточные, бесцветные или розового цвета. Колонии гриба желто-розового цвета (трихотециум (*Trichotecium*)) (рис. 22).

Конидиеносцы и конидии иной формы.

10. Конидиеносцы ветвятся. Ветвление простое, реже вильчатое. Простые (как исключение просто ветвящиеся) конидиеносцы имеют на конце булаво-видное или пузыревидное вздутие, иногда такое вздутие отсутствует.

11. Конидии крупные, неправильной формы, усеяны бородавочками, расположены цепочками, окрашены в коричневый цвет. Колонии сначала пушистые, потом слизистые, с сильным неприятным запахом (акаулиум (*Acaulium*)).

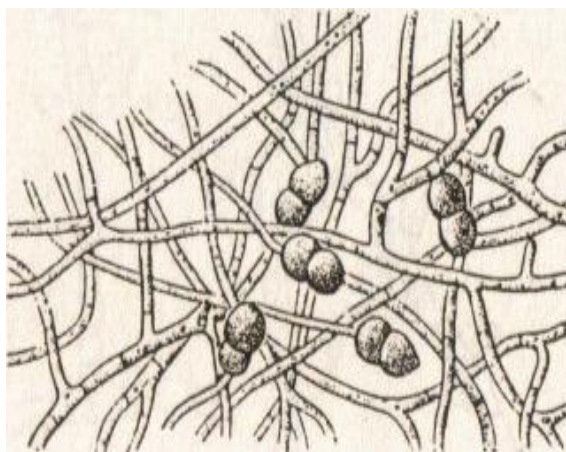


Рис. 22. *Trichotecium*

Конидии бесцветные, длинные, серповидные, многоклеточные (с поперечными перегородками), иногда расположены цепочкой одна за другой или появляются прямо на мицелии. Колонии гриба часто окрашены в розовый цвет (особенно нижняя сторона) (фузариум (*Fusarium*)) (рис. 23).

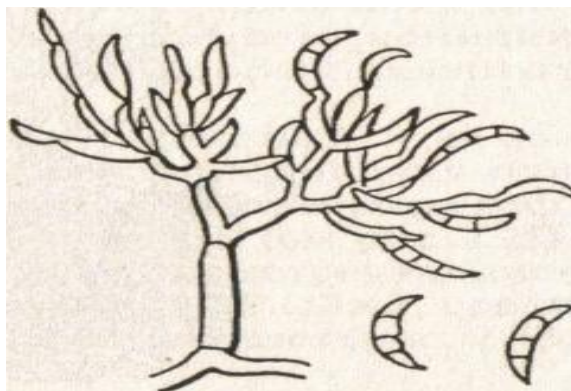


Рис. 23. *Fusarium*

12. Концы конидиеносцев булабовидно или пузыревидно раздуты и кругом покрыты стеригмами, несущими цепочки конидий.

Расширение на конце часто отсутствует, стеригмы располагаются только на вершине конидиеносцев, но не растут по сторонам. Конидии мелкие, округлые, гладкие, бесцветные, на стеригмах располагаются цепочками (цитромичес (*Cytromyces*)).

13. Стеригмы, покрывающие булабовидные вздутия, простые, неветвящиеся, несут цепочки конидий. Конидии округлые, гладкие или шиповатые, окрашенные или бесцветные (аспергиллус (*Aspergillus*)) (см. рис. 17).

14. Конидии образуются прямо на мицелии. Конидии образуются на конидиеносцах, мало отличающихся от обыкновенных гиф.

15. Конидиеносцы видны лишь при культуре в «висячей капле». Конидии легко рассыпаются. Места образования конидий видны в обычном микроскопическом препарате.

16. Одноклеточные конидии, бесцветные, веретеновидные или округлоудлиненные. Колонии слизистые, черные (дематийум (*Dematium*)) (рис. 2.4).

Конидии одноклеточные, яйцевидные, дрожжеобразные. Молодые колонии похожи на дрожжевидные, потом становятся лохматыми (монилия (*Monilia*)) (рис. 25.)

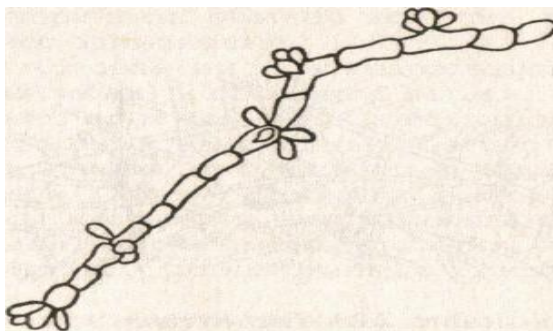


Рис. 24. *Dematium*

17. Конидии получают простым делением мицелия и легко отпадают, бесцветные, прямоугольные, иногда соединены в короткие цепочки (оидиум (*Oidium*)) (см. рис. 14).

Конидиеносцы длинные, многоклеточные. Конидии неправильной формы (длинные, округлые или лимонообразные), окрашены в светлый оливково-зеленый цвет (кладоспориум (*Cladosporium*)) (рис. 26).

18. На медленно растущих колониях нет настоящих конидиеносцев. Мелкие, блестящие, желто-коричневого цвета конидии образуются очень длинными цепочками на концах обыкновенных гиф (катенулария (*Catenularia*)).

Крупные, многоклеточные, округло-грушевидной или заостренно-вытянутой формы конидии образуются в одиночку или короткими цепочками на коротких боковых ветвях вегетативных гиф, играющих роль конидиеносцев (альтернария (*Alternaria*)).

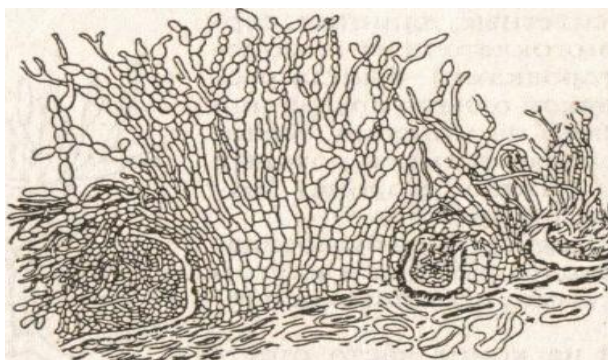


Рис. 25. *Monilia*

Есть и другие грибы, не вошедшие в определитель, но встречающиеся на пищевых продуктах, среди них есть грибы, патогенные для человека, вызывающий аспергиллез легких.

Студент должен идентифицировать грибы до рода, заполнить табл. 5 и схематично зарисовать органы спороношения.

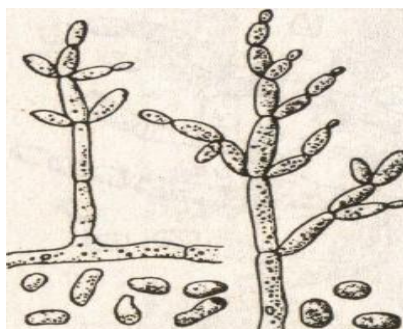


Рис. 26. *Cladosporium*

Задание для выполнения на занятии

1. Законспектировать материал занятия.
2. Выполнить лабораторную работу в соответствии с методикой, зарисовывая рисунки и заполняя таблицы.

Таблица 5

Род плесневого гриба

Номер п/п	Органы спороношения (рисунок)	Род гриба

Контрольные вопросы

1. Каково строение тела гриба?
2. Какие признаки грибов называются культуральными?
3. Как приготовить препарат плесневых грибов?
4. Как размножаются грибы?
5. Какие типы спор бывают у грибов?
6. Чем различается строение конидиеносцев у разных плесневых грибов?

Домашнее задание

1. Зарисовать грибы, не вошедшие в определитель, но встречающиеся на пищевых продуктах.
2. Написать реферат на одну из предложенных ниже тем:
 Вклад Луи Пастера в развитие микробиологии пищевых продуктов.
 Морфология и систематика бактерий.
 Токсикозы и токсикоинфекции микробной природы.
 Влияние факторов внешней среды на жизнедеятельность микроорганизмов.
 Микрофлора воды.
 Микрофлора воздуха.
 Микрофлора почвы.
 Листериоз.
 Бациллы – возбудители пищевых токсикоинфекций.

Микрофлора мяса.
Микрофлора колбас.
Микрофлора мясных консервов.
Микрофлора молока.
Микрофлора кисломолочных продуктов.
Микрофлора молочных консервов.
Микрофлора яиц и яичных продуктов.
Микрофлора свежих плодов и овощей.
Микрофлора рыбы и рыбных товаров.
Микрофлора кулинарных рыбных блюд.
Аппараты и приборы, используемые в микробиологической практике.
Патогенные микроорганизмы.
Условно-патогенные микроорганизмы.

Лабораторно-практическое занятие № 5

Изучение влияния температуры на развитие плесневых грибов

Цель работы: определить оптимальную температуру роста плесневого гриба.

Оборудование и инструменты: чашки Петри с питательной средой для культивирования плесневых грибов, препаровальные иглы, флакон со смесью спирта и глицерина, чашки Петри или пробирки с культурой плесневого гриба.

Методические указания. После объяснений преподавателя студенты конспектируют материал занятия и осваивают нижеизложенные методики, выполняя задания в соответствии с разделом «Задание для выполнения на занятии».

Методика выполнения лабораторной работы.

1. Сделать посев на чашки Петри (уколом в трех местах) спор плесневого гриба.
2. Поместить чашки Петри в термостаты с разной температурой вверх дном.
3. На следующем занятии измерить диаметр выросших колоний плесневых грибов и определить интенсивность роста. Показателем влияния температуры на развитие гриба служат диаметр колоний, выросших на агаризованной среде, отсутствие или наличие спороношения, а также степень спороношения, которая обычно устанавливается по величине окрашенной зоны колоний и интенсивности окраски.
4. Результаты внести в табл. 6. По результатам исследований сделать вывод, какая температура является оптимальной для роста данного плесневого гриба.

Таблица 6

Выявление оптимальной температуры роста и спороношения плесневых грибов

Название плесневого гриба	Показатель интенсивности развития (диаметр колонии, мм)	Температура выращивания, °С			
		5	20	30	40

Примечание. Для заполнения таблицы использовать следующие обозначения: +++ обильное спороношение, ++ умеренное спороношение; + слабое спороношение.

Задание для выполнения на занятии

3. Законспектировать материал занятия.
4. Выполнить лабораторную работу в соответствии с методикой, зарисовывая рисунки и заполняя таблицы.

Контрольные вопросы

1. Как устанавливается влияние температуры на изучаемый микроорганизм?
2. В каких пределах температуры развиваются плесневые грибы?

Лабораторно-практическое занятие № 6

Определение термоустойчивости бесспорных и спорных бактерий

Цель работы: определить термоустойчивость бесспорных и спорных бактерий.

Оборудование и инструменты: четыре чашки Петри с агаризованной средой для роста бактерий, водяные бани на 60 и 80 °С, восемь пробирок с 9 см³ стерильного физиологического раствора, культуры бесспорных и спорообразующих бактерий, выросших на плотной питательной среде.

Методические указания. После объяснений преподавателя студенты конспектируют материал занятия и осваивают нижеизложенные методики, выполняя задания в соответствии с разделом «Задание для выполнения на занятии».

Методика выполнения лабораторной работы

Схема посева представлена рис. 27.

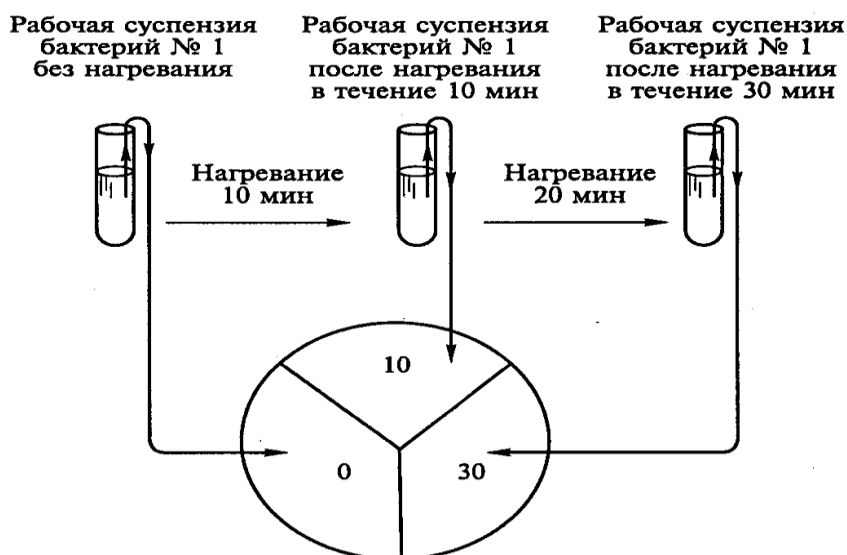


Рис. 27. Чашки Петри: определение термоустойчивости бактерий

1. Четыре чашки Петри с сухим питательным агаром (СПА): две чашки Петри предназначены для посева беспоровых бактерий, две - для посева споровых бактерий. Посевы осуществляются до нагревания и после выдерживания при температуре 60 и 80 °С на водяной бане. На крышке чашки Петри подписать номера и значение испытываемой температуры: две чашки Петри на 60 °С (№ 1 и 2) и две чашки Петри на 80 °С (№ 3 и 4); дно расчертить на три сектора. Один сектор чашки Петри предназначен для посева суспензии бактерий перед ее нагревом (контроль) и обозначается цифрой 0; два других сектора - для посева суспензий после их нагрева в течение 10 и 30 мин.

2. Подготовить исходные суспензии бактерий в четырех пробирках с 9 см³ стерильного физиологического раствора. Пробирки подписать.

3. Подготовить «рабочие» суспензии бактерий:

- в пробирки № 1, 2 внести стерильной пипеткой по 0,1 см³ суспензии беспоровых палочковидных бактерий;
- в пробирку № 3 внести стерильной пипеткой 0,1 см³ суспензии споровых бактерий;
- в пробирку № 4 внести следующей стерильной пипеткой 0,1 см³ суспензии микрококков.

Содержимое пробирок с «рабочими» суспензиями тщательно перемешать.

4. Для опыта с температурой 60 °С посеять в чашку Петри № 1 (в середину сектора 0) суспензию № 1, в чашку Петри № 2 - суспензию № 3.

5. Для опыта с температурой 80 °С посеять в чашку Петри № 3 (сектор 0) суспензию № 2, в чашку Петри № 4 - суспензию № 4.

Посев производить стерильной бактериологической петлей путем легкого прикосновения ее ребра к среде.

6. Поместить на 10 мин пробирки № 1 и 3 с «рабочими» суспензиями в водяную баню на 80 °С; пробирки № 2 и 4 поместить в водяную баню на 60

°С. Уровень воды в водяной бане должен быть выше уровня суспензий в пробирках.

7. После нагревания в течение 10 мин сделать посев суспензий I бактериологической петлей в секторы чашек Петри № 1 и 2, обозначенные цифрой 10, соответственно из пробирок № 1 и 3.

8. Пробирки с «рабочими» суспензиями поместить в те же бани и выдерживать еще в течение 20 мин (продолжительность суммарного нагрева 30 мин), а затем высеять суспензии в секторы СПА, обозначенные цифрой 30.

9. Поставить засеянные чашки Петри в термостат при температуре 30 °С.

10. Последовательность проведения опыта записать.

11. На следующем занятии просмотреть чашки Петри. Во всех вариантах опыта выявить наличие и интенсивность роста колоний бактерий. Результаты внести в табл. 7. По результатам исследований сделать вывод.

Таблица 7

Определение термоустойчивости бактерий

Бактерии	Оценка роста бактерий				
	без нагревания	после нагревания при температуре			
		60 °С		80 °С	
		Продолжительность, мин			
		10	30	10	30
Споровые					
Бесспоровые					

Примечание. Для заполнения таблицы использовать следующие обозначения: +++ обильный рост; ++ умеренный рост; + слабый рост; - отсутствие роста.

Задание для выполнения на занятии

1. Законспектировать материал занятия.
2. Выполнить лабораторную работу в соответствии с методикой, зарисовывая рисунки и заполняя таблицы.

Контрольные вопросы

1. Какие способы хранения пищевых продуктов основаны на использовании низких и высоких температур?
2. Как устанавливается термоустойчивость изучаемых микроорганизмов?

3. Чем объяснить различия в термоустойчивости споровых и бесспорных бактерий?

Лабораторно-практическое занятие № 7

Определение влияния фитонцидов и антибиотиков на бактерии

Цель работы: определить влияние фитонцидов лука, чеснока и других пряных овощей на бактерии, а также антибиотиков.

Оборудование и инструменты: измельченные лук, чеснок и другие пряные овощи, бумажные диски с антибиотиками, чашки Петри с плотной питательной средой, которые засеваются бактериями различных родов сплошным посевом; спиртовые горелки, пинцеты.

Методические указания. После объяснений преподавателя студенты конспектируют материал занятия и осваивают нижеизложенные методики, выполняя задания в соответствии с разделом «Задание для выполнения на занятии».

Фитонциды - это вещества, выделяемые высшими растениями и обладающие антимикробным действием. Они различны по химической природе и силе действия. Одни из них вызывают гибель микроорганизмов, другие лишь угнетают их развитие. Фитонциды обладают избирательностью: каждый действует только на определенные микроорганизмы. Эффект действия зависит от его продолжительности, условий и устойчивости микроорганизма. Некоторые фитонциды выделены в чистом виде и нашли практическое применение.

Антибиотики - вещества биологического происхождения, способные подавлять рост микроорганизмов (бактериостатические, фунгистатические) или убивать их (бактерицидные, фунгицидные и др. антибиотики).

Методика выполнения лабораторной работы

1. В центр засеянных чашек Петри поместить небольшое количество измельченной массы лука, чеснока и др. Одна чашка остается контрольной (на засеянную поверхность среды лук, чеснок и другие пряные овощи не наносится). Мысленно разделить чашку Петри на шесть секторов и в каждый сектор поместить по диску с антибиотиками. Работу выполнять с помощью профламбированного пинцета.

2. Поместить чашки Петри в термостат при температуре 24 °С.

3. На следующем занятии провести анализ посева. Для выявления действия лука, чеснока и других пряных овощей на бактерии отмечается, сопоставляя с контрольной чашкой Петри, равномерно ли растут бактерии вокруг измельченного лука и чеснока, а также антибиотиков, появилась ли вокруг

кашицы из лука, чеснока, дисков с антибиотиками, стерильная зона (зона отсутствия роста бактерий).

Появление стерильной зоны говорит о бактерицидном действии фитонцидов лука и чеснока на бактерии или бактериостатическом (бактерицидном) действии антибиотиков. Чем больше диаметр стерильной зоны, тем более сильное действие оказывает данный фитонцид или антибиотик на бактерии (рис. 28).

Результаты внести в табл. 8.

Сделать вывод: есть ли активность фитонцидов и антибиотиков, как велика их зона действия.

Таким же образом можно определить действие антисептиков, различных пищевых добавок, красителей др.

Задание для выполнения на занятии

1. Законспектировать материал занятия.
2. Выполнить лабораторную работу в соответствии с методикой, зарисовывая рисунки и заполняя таблицы.

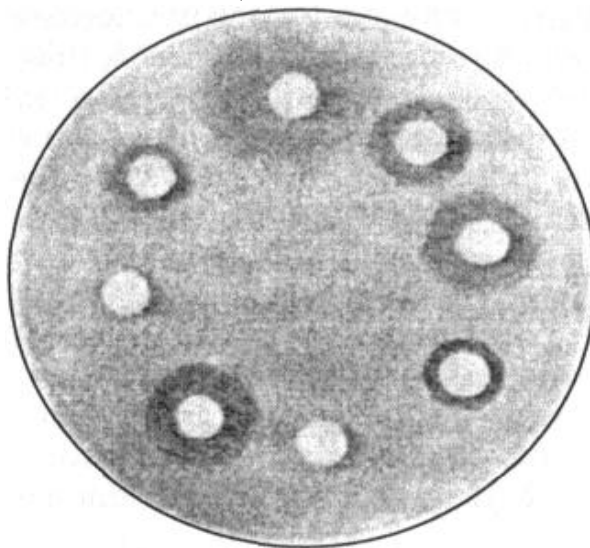


Рис. 28. Пример действия фитонцидов на бактерии

Таблица 8

Действие фитонцидов лука и чеснока на бактерии

Культура бактерий	Показатели проявления фитонцидности	Диаметр стерильной зоны, мм			
		Лук	Чеснок		

--	--	--	--	--	--

Контрольные вопросы

1. Что такое фитонциды?
2. Какими свойствами обладают фитонциды?
3. Как выявить фитонцидные свойства плодов, овощей, зеленых культур?

Лабораторно-практическое занятие № 8

Определение влияния концентрации поваренной соли в среде на бактерии

Цель работы: определить, при какой концентрации поваренной соли NaCl в среде могут развиваться бактерии.

Оборудование и инструменты: четыре пробирки с питательным бульоном: одна контрольная (без добавления соли) и с добавлением 5, 10 и 20 % хлорида натрия, культура бактерии на агаризованной питательной среде, пробирка с физиологическим раствором для приготовления бактериальной суспензии.

Методические указания. После объяснений преподавателя студенты конспектируют материал занятия и осваивают нижеизложенные методики, выполняя задания в соответствии с разделом «Задание для выполнения на занятии».

Концентрация растворенных в среде веществ имеет большое значение для роста микроорганизмов. От концентрации этих веществ в среде и, следовательно, от величины ее осмотического давления зависит процесс поступления питательных веществ в клетку микроорганизмов путем осмоса.

Вода и питательные вещества поступают в клетку, если осмотическое давление в ней больше, чем в среде.

Повышение концентрации веществ в среде приводит к замедлению процесса поступления воды в клетку в связи с уменьшением разности между концентрацией веществ в клетке и среде. Оно может прекратиться вовсе, если концентрация веществ в среде окажется больше, чем в клетке, и тогда клетки обезвоживаются, плазмолизируются.

Многие микроорганизмы чувствительны к изменению привычной для них концентрации веществ в среде, некоторые приспосабливаются к этому. Есть и такие, которые развиваются только в среде с высокой концентрацией веществ, т.е. живут при высоком осмотическом давлении, они называются осмофильными. Осмофильные микроорганизмы, устойчивые к высоким концентрациям поваренной соли, называются галофилами.

Методика выполнения лабораторной работы

1. Приготовить суспензию бактерий.
2. Пробирки засеять суспензией бактерий, подписать и поставить в термостат при температуре 30 °С.
3. На следующем занятии оценить интенсивность развития бактерий в контрольной и опытных пробирках после тщательного перемешивания содержимого пробирок. Оценка осуществляется по степени мутности бульона. Результаты записать в табл. 9.
По результатам исследований сделать вывод.

Задание для выполнения на занятии

1. Законспектировать материал занятия.
2. Выполнить лабораторную работу в соответствии с методикой, зарисовывая рисунки и заполняя таблицы.

Таблица 9

Влияние концентрации поваренной соли на рост бактерий

Культура бактерий	Концентрация NaCl, %			
	0	5	10	20
	Оценка роста бактерий			

Примечание. Для заполнения таблицы использовать следующие обозначил: +++ обильный рост; ++ умеренный рост; + слабый рост; - отсутствие роста.

Контрольные вопросы

1. Как устанавливается влияние концентрации среды на изучаемый микроорганизм?
2. Что такое осмофильные микроорганизмы?
3. Что такое галофильные микроорганизмы?

Лабораторно-практическое занятие № 9

Определение влияния pH среды на бактерии

Цель работы: определить влияние pH среды на развитие бактерий.

Оборудование и инструменты: четыре пробирки с питательным бульоном с разным значением pH (3, 5, 7, 9) культуры бактерии на агаризованной питательной среде, пробирка с физиологическим раствором для приготовления бактериальной суспензии.

Методические указания. После объяснений преподавателя студенты конспектируют материал занятия и осваивают нижеизложенные методики, выполняя задания в соответствии с разделом «Задание для выполнения на занятии».

Отношение микробов к реакции среды очень разнообразно. Каждый вид микроорганизмов развивается в определенных пределах значений pH среды. При минимальном и максимальном значении pH жизнедеятельность микроорганизмов протекает очень медленно, при оптимальном - наиболее интенсивно. При значении pH ниже минимального и выше максимального жизнедеятельность микроорганизмов прекращается и наблюдается даже их отмирание.

Для большинства плесневых грибов и дрожжей наиболее благоприятной является слабокислая среда, для бактерий - нейтральная.

Методика выполнения лабораторной работы

1. Приготовить питательную среду в пробирках с разными значениями pH: 3, 5, 7, 9. Сделать посев суспензии бактерий в каждую пробирку и поставить в термостат при температуре 30 °С.

2. На следующем занятии произвести оценку интенсивности роста изучаемых бактерий по степени мутности среды после тщательного перемешивания содержимого пробирок.

Результаты записать в табл. 10. По результатам исследований сделать вывод.

Таблица 10

Развитие бактерий при разных значениях pH среды

Культуры бактерии	Интенсивность развития бактерий			
	Значения pH среды			
	3	5	7	9

Примечание. Для заполнения таблицы использовать следующие обозначения: +++ обильное развитие; ++ умеренное развитие; + слабое развитие; - отсутствие роста.

Задание для выполнения на занятии

1. Законспектировать материал занятия.
2. Выполнить лабораторную работу в соответствии с методикой, зарисовывая рисунки и заполняя таблицы.

Контрольные вопросы

1. Как устанавливается влияние рН среды на изучаемые микроорганизмы?
2. В каких пределах значений рН развиваются бактерии, дрожжи, грибы?

Лабораторно-практическое занятие № 10

Определение микробиологической безопасности питьевой воды

Цель работы: определить общее содержание микроорганизмов и наличие бактерий группы кишечной палочки в питьевой воде.

Оборудование и инструменты: образец питьевой воды для исследования, пробирки со стерильной водой (1%-ный раствор пептона или физиологический раствор) для приготовления разведения, пробирки со стерильной средой Кесслера, стерильные чашки Петри, стерильные пипетки, дозатор, агаризованная питательная среда для культивирования бактерий.

Методические указания. После объяснений преподавателя студенты конспектируют материал занятия и осваивают нижеизложенные методики, выполняя задания в соответствии с разделом «Задание для выполнения на занятии».

Для выполнения лабораторной работы студенты сами могут принести воду в стерильной посуде из источников, которые они хотели бы обследовать. Стерильную посуду необходимо заранее приготовить и простерилизовать в лаборатории. Для опытов можно использовать емкости с завинчивающимися крышками.

Вода является естественной средой многих микроорганизмов.

Микрофлора попадает в водоемы из почвы, из воздуха, с отбросами промышленных предприятий и сточными водами. Основным источником загрязнения открытых водоемов микроорганизмами, среди которых могут быть и патогенные, служат сточные воды.

Питьевую воду тщательно очищают и обеззараживают. Оценка качества питьевой воды осуществляется комплексно по органолептическим, гельминтологическим, физико-химическим и микробиологическим показателям.

Обнаружение в воде патогенных микроорганизмов свидетельствует об ее непригодности к употреблению, поэтому главное требование к качеству воды - отсутствие патогенных микроорганизмов.

В настоящее время в соответствии с ГОСТ 2874-82 «Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством» определяют следующие микробиологические критерии качества питьевой воды:

- КМАФАнМ (количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов) в питьевой воде не должно превышать 100 колониеобразующих единиц (КОЕ/см³);

- бактерии группы кишечной палочки (БГКП) не допускаются в 100 КОЕ/см³, или допускаются в количестве не более 3 КОЕ на 1 л воды.

Вода колодцев может содержать не более 10 клеток кишечных палочек на 1 л. Колодцы не обеззараживаются, а возможность биологической контаминации очень велика: микроорганизмы попадают в колодец с осадками, просачиваются с загрязненными ливневыми и грунтовыми водами. Вода в колодцах должна постоянно находиться под контролем.

Коли-титр - это наименьший объем воды, в котором обнаруживается одна клетка БГКП.

Коли-индекс - это определенное количество клеток БГКП в 1 л воды.

Методика выполнения лабораторной работы

1. Определение общего количества бактерий в воде

Подписать в соответствии со схемой пробирки для приготовления разведения и засеваемые чашки Петри (рис. 29).

Тщательно перемешать пробу воды и стерильной пипеткой с помощью дозатора внести из колбы (или другой исходной емкости) по 1 мл в две стерильные чашки Петри, слегка приоткрывая крышки. Этой же пипеткой внести 1 мл воды в пробирку с водой для приготовления первого разведения 1:10. Стерильной пипеткой перемешать содержимое первой пробирки и из этой пробирки пипеткой, которой перемешивали, внести по 1 мл в две стерильные чашки и во вторую пробирку со стерильной водой для приготовления следующего разведения 1:100.

Аналогично выполнить посев следующего разведения.

После внесения воды в каждую чашку внести 12-15 мл расплавленной и остуженной до температуры 39-45°C агаризованной питательной среды после фламбирования края емкости, в которой она содержится. Затем быстро перемешать круговыми движениями содержимое чашек, равномерно распределяя питательную среду по всему дну. Делать это следует аккуратно, на горизонтальной поверхности, не отрывая чашку от поверхности стола, избегая образования пузырьков воздуха, попадания агара на края и крышку чашки Петри. Чашки оставить на 10-15 мин для застывания среды.

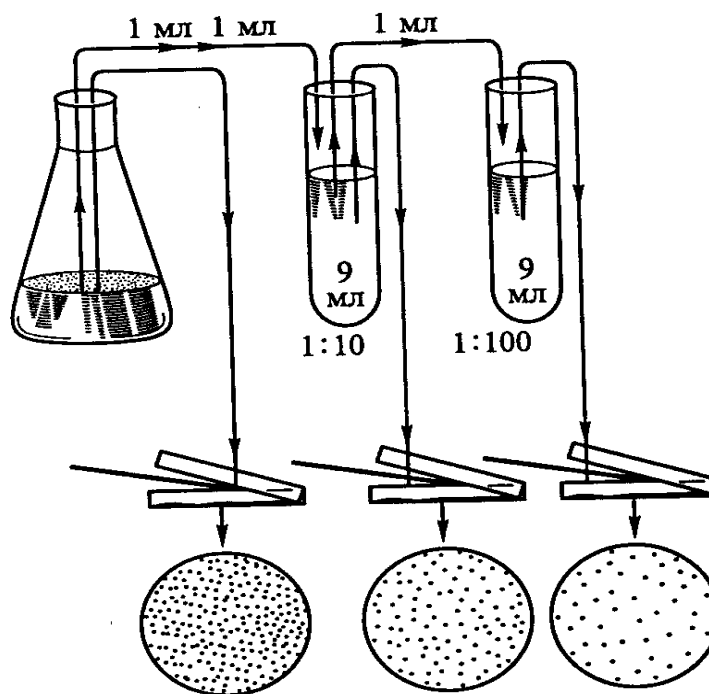


Рис. 29 Схема приготовления разведений и высева в чашки Петри

После застывания среды чашки Петри с посевами поместить в термостат вверх дном и инкубировать при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 2) ч.

Из каждой пробы воды должен быть сделан посев так, чтобы на чашках Петри выросло от 15 до 300 колоний. Как правило, на чашку Петри засевают 1 и 0,1 мл воды. Если вода заведомо грязная, делают несколько разведений и из каждого разведения засевают по 1 мл.

Через 24 ч (допускается на следующем занятии) подсчитать колонии, выросшие как на поверхности, так и в глубине агара и видимые при увеличении в 2 раза. Учитывают только те чашки, на которых выросло не более 300 изолированных колоний. Количество колоний на обеих чашках с параллельными разведениями суммируют и делят на два.

Результат выражают количеством КОЕ в 1 см^3 (мл) исследуемой воды. Результаты заносят в табл. 11.

Таблица 11

Микробиологические показатели качества воды

Категория воды	КМАФАнМ, КОЕ/ см^3 (мл)	
	Норматив	Результат
Вода питьевая	Не более 100	
Вода водопроводная	Тоже	
Вода питьевая из колодцев, родников	Не нормируется	

Сравнив полученные результаты с нормативами, сделать вывод о качестве анализируемой воды.

2. Определение бактерий группы кишечной палочки в воде

Обнаружение в воде бактерий группы кишечной палочки следует рассматривать как показатель фекального загрязнения воды, а их количество позволяет судить о степени этого загрязнения.

Количество бактерий группы кишечной палочки определяют двумя методами: методом мембранных фильтров и бродильным методом с помощью определения наиболее вероятного числа (НВЧ).

Определение присутствия БГКП в определенном объеме воды также проводится с помощью метода мембранных фильтров и бродильного метода.

Присутствие БГКП выражается с помощью понятий коли-титр и коли-индекс.

Метод определения присутствия бактерий группы кишечной палочки заключается в посеве определенных объемов анализируемой воды и инкубировании их при температуре 37 °С в среде накопления с последующим высевом выделенных бактерий на дифференциально-диагностическую агаризованную среду и определении их принадлежности к БГКП. В табл. 12 представлены нормативы на питьевую воду.

3. Определение коли-титра

Определить коли-титр исследуемого образца, для чего выявить присутствие БГКП в 100, 10, 1, 0,1, 0,01 мл питьевой воды.

Таблица 12

Санитарно-микробиологические показатели воды

Объект исследования	Коли-титр, мл	Коли-индекс
	Норматив	Норматив
Вода питьевая водопроводная	Не менее 300	Не более 3
Вода питьевая из колодцев, родников	Не менее 100	Не более 10

Подписать в соответствии со схемой пробирки для приготовления разведения и засеваемые колбы и пробирки с лактозосодержащей средой (рис. 30). Большие объемы воды вносятся в большие емкости исходя из принципа: объем воды к двойному объему питательной лактозосодержащей среды (среда Кесслера). Допускается использование питательной среды двойной концентрации при посеве больших объемов, в этом случае объем засеваемой воды должен быть равен объему питательной среды двойной концентрации. В случае использования одинарной среды соотношение между объемом засеваемой воды и питательной средой должно быть 1:9

Перемешать в стерильных емкостях пробу воды (мерный стакан, цилиндр) и выполнить внесение анализируемых объемов в колбы со средой Кесслера (100 и 10 мл).

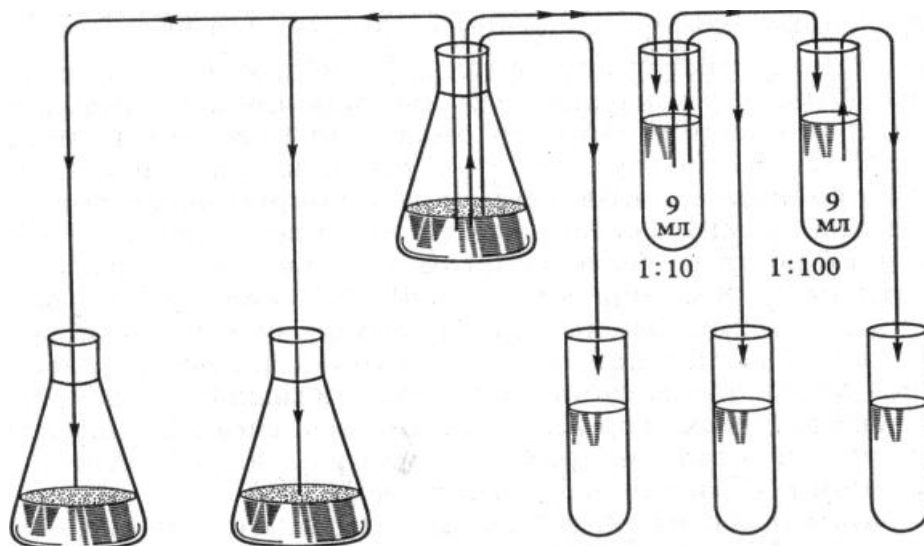


Рис. 30 Схема приготовления разведений и посева в пробирки со средой Кесслера

Перемешать пробу воды и стерильной пипеткой с помощью дозатора внести из колбы (или другой исходной емкости) по 1 мл в две пробирки со средой Кесслера. Этой же пипеткой внести 1 мл воды в пробирку с водой для приготовления первого разведения - 1:10

Стерильной пипеткой перемешать содержимое первой пробирки и из этой пробирки пипеткой, которой перемешивали, внести по 1 мл в две пробирки со средой Кесслера и во вторую пробирку со стерильной водой для приготовления следующего разведения - 1:100

Если вода предположительно грязная, делают несколько разведений и из каждого разведения засевают по 1 мл, т.е. выполняют посев 0,1, 0,01, 0,001 мл воды.

После выполнения посева колбы и пробирки со средой Кесслера с посевами поместить в термостат и инкубировать при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение (4 ± 2) ч.

Через 48 ч провести предварительную оценку посевов на среде Кесслера. Отмечают как положительные пробирки, в которых имеет место рост микроорганизмов, выражающийся в помутнении среды, газообразовании (пузырек газа улавливается поплавком маленькой пробиркой, размещенной в пробирке со средой вверх дном) и подкислении среды (изменение цвета среды). Емкости без наличия роста и образования газа оставляют в термостате и окончательно просматривают через 48 ч. Посевы без признаков роста считают отрицательными и дальнейшему исследованию они не подлежат. Из емкостей, в которых отмечено помутнение, изменение цвета и образование газа, делают высев на дифференциально-диагностические среды. Если имеется

один из вышеуказанных признаков роста бактерий, то пробирка также считается положительной и из нее производится высев.

Выполнить пересев на дифференциально-диагностическую среду Эндо. Пересев производится бактериологической петлей на секторе или целую чашку среды для получения изолированных колоний. Чашки с посевами поместить в термостат и инкубировать при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 18-20 ч.

На следующем занятии проанализировать результаты посевов. БГКП образуют на среде Эндо темно-красные, красные и розовые колонии, часто с металлическим блеском.

В случае обнаружения подозрительных колоний проводят окраску клеток бактерий по Граму. В случае обнаружения грамотрицательных коротких неспорообразующих палочек делают вывод о присутствии в исследуемом образце питьевой воды БГКП. Результаты занести в табл. 13.

По результатам исследований сделать вывод.

Таблица 13

Результаты исследований по определению наличия в питьевой воде БГКП

Исследуемый образец питьевой воды	Результаты брожения на среде Кесслера	Результаты роста на среде Эндо	Микроскопирование	Вывод

4. Определение коли-индекса

При определении коли-индекса все посева выполняются в трех повторностях. После культивирования определяют НВЧ по табл. 14. Сравнив полученные результаты с нормативными, делают вывод о качестве анализируемой воды.

Таблица 14

Определение коли-индекса бактерий группы кишечной палочки при исследовании 300 мл питьевой воды

Количество положительных результатов анализа воды			Коли-индекс	Пределы индекса		Коли-титр, мл воды
из 3-го флакона по 100 мл	из 3-й пробирки по 10 мл	из 3-й пробирки по 1 мл		нижний	верхний	
0	0	0	Менее 3	-	-	Более 333
0	0	1	3	0,5	9	333
0	1	0	3	0,5	13	333
1	0	0	4	0,5	20	250

1	0	1	7	1	21	143
1	1	0	7	1	23	143
1	1	1	11	3	36	91
1	2	0	11	3	36	91
2	0	0	9	1	36	111
2	0	1	14	3	37	72
2	1	0	15	3	44	67
2	1	1	20	7	89	50
2	2	0	21	4	47	48
2	2	1	28	10	149	86
3	0	0	23	4	120	43
3	1	0	43	7	210	23
3	1	1	75	14	230	13
3	1	2	120	30	380	8
3	2	0	93	15	380	11
3	2	1	150	30	440	7
3	2	2	210	35	470	5
3	3	0	240	36	1300	4
3	3	1	460	71	2400	2
3	3	2	1 100	150	4800	0,9
3	3	3	Более 1 100	-	-	Менее 0,9

Задание для выполнения на занятии

1. Законспектировать материал занятия.
2. Выполнить лабораторную работу в соответствии с методикой, зарисовывая рисунки и заполняя таблицы.

Контрольные вопросы

1. Что такое внешняя окружающая среда?
2. Зачем товароведом и технологам необходимо знать условия окружающей среды?
3. Почему необходимо определять микробиологические показатели воды?
4. Откуда в воду попадают микроорганизмы?
5. Почему в воде не допускается наличие патогенных микроорганизмов?
6. Сколько КОЕ/мл допускается в воде?
7. Что такое НВЧ?
8. Что такое коли-титр и коли-индекс?

Лабораторно-практическое занятие № 11

Определение микроорганизмов воздуха закрытых помещений

Цель работы: определить количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха закрытых (лабораторных) помещений.

Оборудование и инструменты: чашки Петри с агаризованной питательной средой.

Методические указания. После объяснений преподавателя студенты конспектируют материал занятия и осваивают нижеизложенные методики, выполняя задания в соответствии с разделом «Задание для выполнения на занятии».

Воздух является неблагоприятной средой для развития микроорганизмов, так как в нем нет органических веществ. Микрофлора воздуха не постоянна. Микроорганизмы попадают в воздух из почвы, воды, с поверхности растений и т.д. С выделениями больных людей в воздух попадают микроорганизмы и возможно распространение возбудителей инфекционных заболеваний. Воздух может быть источником контаминации микроорганизмами пищевых продуктов.

Санитарное состояние воздуха жилых и производственных помещений оценивают по микробиологическим показателям.

Наиболее простой способ определения контаминации воздуха микроорганизмами - седиментационный (чашечный) метод. Для исследования воздуха проводят экспозицию открытой чашки Петри с застывшей плотной питательной средой, инкубируют посевы, подсчитывают количество выросших колоний и пересчитывают на 1 м³ воздуха, пользуясь формулой Омелянского, который считал, что в течение 5-минутной экспозиции на поверхность плотной питательной среды в 100 см² оседает столько микробных клеток, сколько их в 10 л воздуха. Им была составлена таблица расчета, пользуясь которой можно рассчитать общее количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха (табл. 10).

В таблице даны постоянные множители, на которые надо умножать полученное количество колоний в зависимости от диаметра и площади чашки Петри, на которой производился посев.

Методика выполнения лабораторной работы

1. Чашки Петри с застывшей питательной средой установить в открытом виде в разных помещениях на 5 мин. После эксплуатации чашки Петри закрыть и поместить в термостат при температуре 30 °С на 72 ч (для роста бактерий) и при температуре 24 °С на 5 сут (для роста дрожжей и плесневых грибов).

2. На следующем занятии подсчитать количество выросших колоний на обеих чашках, суммировать и пересчитать на 1 м³ воздуха, пользуясь форму-

лой Омелянского, в соответствии с которой количество микроорганизмов умножается на множитель исходя из диаметра чашки Петри, представленного в табл. 15.

3. В табл. 16 приведены ориентировочные нормативы для оценки контаминации воздуха закрытых помещений.

4. Подсчитав количество колоний на своих чашках Петри и рассчитав количество клеток микроорганизмов в 1 м^3 воздуха, заполнить табл. 5.6. Сравнив полученные результаты с нормативом оценки, сделать вывод о чистоте воздуха в лаборатории.

Пример расчетов

На чашке Петри диаметром 9 см и площадью 63 см^2 выросло 25 колоний. Количество микробов в 1 м^3 воздуха будет равно 25×80 .

Таблица 15

Расчет количества колоний в 1 м^3 воздуха (по Омелянскому)

Диаметр чашки, см	Площадь чашки, см^2	Множитель расчета количества микробов в 1 м^3 воздуха
8	50	100
9	63	80
10	78	60
11	95	50
12	113	45

Таблица 16

Оценка воздуха закрытых помещений

Оценка воздуха		Общее количество бактерий в 1 м^3		Вывод
		Норматив	Результат	
Лето	Чистый	До 1 500		
	Загрязненный	До 2 500		
Зима	Чистый	До 4 500		
	Загрязненный	До 7 000		

Задание для выполнения на занятии

1. Законспектировать материал занятия.

2. Выполнить лабораторную работу в соответствии с методикой, зарисовывая рисунки и заполняя таблицы.

Контрольные вопросы

1. Почему воздух является неблагоприятной средой для развития микробов?
2. Почему товароведу необходимо знать санитарное состояние воздуха?
3. Какие болезни передаются через воздух?
4. В чем суть седиментационного метода определения контаминации воздуха?
5. В чем суть расчета по Омелянскому?

Лабораторно-практическое занятие № 12

Определение микроорганизмов на предметах обихода и оборудовании

Цель работы: определить контаминацию предметов окружающей среды и их санитарно-эпидемиологическое состояние.

Оборудование и инструменты: шаблон для взятия смыва, пробирка с водой (1%-ный раствор пептона или физиологический раствор) для приготовления смыва, пробирки со стерильной водой (1%-ный раствор пептона или физиологический раствор) для приготовления разведений, пробирки для смывов со средой Кесслера, чашки Петри, пипетки, дозатор, агаризованная питательная среда для культивирования бактерий.

Методические указания. После объяснений преподавателя студенты конспектируют материал занятия и осваивают нижеизложенные методики, выполняя задания в соответствии с разделом «Задание для выполнения на занятии».

Санитарно-микробиологическое исследование предметов обихода, оборудования, мелкого инвентаря в торговых помещениях, а также столовой посуды на предприятиях общественного питания проводится для контроля за общим гигиеническим состоянием и определения фекальной загрязненности и контаминации патогенными микроорганизмами объектов окружающей среды как возможных факторов передачи возбудителей инфекционных заболеваний.

Биологическая контаминация объектов окружающей среды происходит постоянно. Главным источником микробного загрязнения является человек: выделения верхних дыхательных путей, слущивающийся эпидермис, волосы, содержащие различные микроорганизмы - сапрофиты, условно-патогенные и патогенные.

Загрязнение патогенными микроорганизмами различных объектов: мелкого торгового инвентаря, санитарной одежды, оборудования, столовой посуды и других - особенно активно и обильно происходит от больных людей.

Попавшие на объекты окружающей среды патогенные микроорганизмы, как правило, не размножаются на них. Такие объекты служат пассивными посредниками при передаче возбудителей инфекционных заболеваний здоровым людям. В основном это возбудители кишечных заболеваний и капельных инфекций (грипп).

Возможность заражения человека зависит от концентрации микроорганизмов, вирулентности, сроков выживания микроорганизмов на объектах окружающей среды.

Большая часть микроорганизмов погибает в первые часы пребывания на объектах окружающей среды, за исключением тех мест, где они меньше подвергаются высушиванию и инсоляции. Долгое время способны сохраняться спорообразующие микроорганизмы.

Длительность сохранения жизнедеятельности некоторых патогенных микроорганизмов приведена в табл. 17.

Отбор проб для санитарно-микробиологического исследования предметов внешней среды и оборудования проводится с помощью метода смыва стерильными ватными тампонами, которые помещены в пробирку.

С поверхности рабочих столов, разделочных досок и других плоских предметов смыв делают с площади 100 см², для чего на исследуемую поверхность накладывают рамку-шаблон (рис. 31).

Для взятия проб с мелкой посуды (ложек, вилок, стаканов и др.) протирают всю поверхность. Для проведения смывов с рук протирают их тампоном, начиная с менее загрязненных участков кожи: тыльную часть ладони, ладонь, межпальцевые поверхности, ногтевые ложа и подноготное пространство.

Определение общей микробной контаминации объектов окружающей среды производят из смывов, проведенных с анализируемой площади. Объем жидкости в пробирках доводят до 10 мл, добавляя стерильный изотонический раствор хлорида натрия, и получают исходное разведение 1:10. После интенсивного встряхивания готовят десятикратные разведения. В зависимости от предполагаемой загрязненности посеvy производят из нескольких разведений. Посевы инкубируют при температуре 37 °С в течении 24 ч.

Таблица 17

Длительность сохранения жизнедеятельности патогенных микроорганизмов на объектах окружающей среды

Микроорганизмы	Сроки выживания, дни			
	на бумаге	на тканях	на игрушках	на посуде
Сальмонеллы брюш-	60	До 80	-	До 70

ного тифа				
Шигеллы	14-60	17-36	-	До 25
Энтеропатогенные эшерихии	-	-	15-34	-
Вибрионы холеры	1	2-36	-	-
Коринебактерии дифтерии	8	5-28	До 150	До 18
Микобактерии туберкулеза	-	До 330	-	До 226

Заключение по общей обсемененности делают на основании расчетов по формуле

$$M = H \times 10 / S, (1)$$

где M - общая бактериальная обсемененность;

H - количество колоний в 1 мл исходного разведения смыва;

10 - количество жидкости, в которую сделан смыв (мл);

S - площадь, с которой произведен смыв, см².

Рассчитав общую обсемененность объекта и определив присутствие БГКП, делают вывод о санитарном состоянии объекта.

Обнаружение бактерий группы кишечной палочки в смывах - показатель неудовлетворительного санитарно-эпидемиологического состояния объекта исследования. Дополнительно на исследуемой поверхности может быть определено присутствие различных групп микроорганизмов: коагулазоположительных стафилококков, плесневых грибов, дрожжей и др.

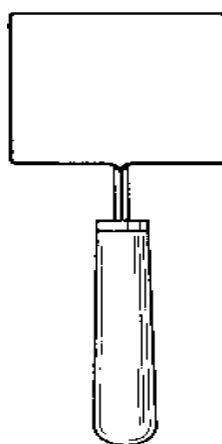


Рис. 31 Шаблон для взятия смывов с определенной площади

Методика выполнения лабораторной работы

1. Перед взятием пробы шаблон профламбировать. Сделать два смыва с поверхности изучаемого предмета. Первый - в пробирку с водой для посева на общую контаминацию и второй - для выявления БГКП.

2. После взятия смыва пробирку со средой Кесслера с посевом поместить в термостат и инкубировать при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (48 ± 2) ч.

3. С помощью дозатора внести из пробирки со смывом по 1 мл в две стерильные чашки Петри, слегка приоткрывая крышки. Этой же пипеткой внести 1 мл воды в пробирку с водой для приготовления первого разведения 1:10.

4. Стерильной пипеткой перемешать содержимое первой пробирки и из этой пробирки пипеткой, которой перемешивали, внести по 1 мл в две стерильные чашки и во вторую пробирку со стерильной водой для приготовления следующего разведения - 1:100.

Дополнительные разведения и их посевы выполняются в случае исследования заведомо грязных поверхностей.

5. Аналогично выполнить посев следующего разведения.

6. По окончании внесения воды в каждую чашку Петри добавить 12-15 мл расплавленной и остуженной до температуры $39-45^\circ\text{C}$ агаризованной питательной среды после фламбирования края емкости, в которой она содержится. Затем быстро перемешать круговыми движениями содержимое чашек, равномерно распределяя питательную среду по всему дну. Делать это следует аккуратно, на горизонтальной поверхности, не отрывая чашку от поверхности стола, избегая образования пузырьков воздуха, попадания агара на края и крышку чашки Петри. Чашки оставить на 10-15 мин для застывания среды.

7. После застывания среды чашки Петри с посевами поместить в термостат вверх дном и инкубировать при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (72 ± 2) ч.

8. Через 72 ч (допускается на следующем занятии) подсчитать количество колоний, выросших как на поверхности, так и в глубине агара и видимые при увеличении в 2 раза. Учитывают только те чашки, на которых выросло не более 300 изолированных колоний. Количество колоний на обеих чашках с параллельными разведениями суммируют и делят на два. Результат выражают числом КОЕ на 1 см^2 исследуемой поверхности. Результаты занести в табл. 5.8. Сравнив полученные результаты с нормативными, сделать вывод о состоянии анализируемой поверхности.

9. Через 48 ч провести предварительную оценку посевов на среде Кесслера. Отмечают как положительные пробирки, в которых имеет место рост микроорганизмов, выражающийся в помутнении среды, газообразовании (пузырек газа улавливается поплавком - маленькой пробиркой, размещенной в пробирке со средой вверх дном) и подкислении среды (изменение цвета среды). Емкости без наличия роста и образования газа оставляют в термостате и окончательно просматривают через 48 ч. Посевы без признаков роста считают отрицательными и дальнейшему исследованию они не подлежат. Из емкостей, в которых отмечено помутнение, изменение цвета и образование газа, делают высев на дифференциально-диагностические среды. Если имеется

один из указанных признаков роста бактерий, то пробирка также считается положительной и из нее производится высеv.

10. Выполнить пересев на дифференциально-диагностическую среду Эндо. Пересев производится бактериологической петлей на сектор или целую чашку среды для получения изолированных колоний. Чашки с посевами поместить в термостат и инкубировать при температуре $(37 \pm 1)^\circ \text{C}$ в течение 18-20 ч.

11. На следующем занятии проанализировать результаты посевов. БГКП образуют на среде Эндо колонии темно-красного, красного и розовые цвета, часто с металлическим блеском.

12. В случае обнаружения подозрительных колоний проводят окраску по Граму. В случае обнаружения грамотрицательных коротких непорообразующих палочек делают вывод о присутствии на исследуемом образце БГКП.

Результаты занести в табл. 19.

По результатам исследований сделать вывод на основании данных исследования и табл.18.

Задание для выполнения на занятии

1. Законспектировать материал занятия.
2. Выполнить лабораторную работу в соответствии с методикой, зарисовывая рисунки и заполняя таблицы.

Таблица 18

Критерии оценки по санитарно-микробиологическим тестам предметов окружающей среды (по Педенко)

Оценка объекта	Общая микробная обсемененность, КОЕ/см ²	Результат	Вывод
Чистый	до 10000		
Умеренно загрязненный	10000...100000		
Сильно загрязненный	более 100000		

Таблица 19

Санитарно-микробиологическое состояние предметов окружающей среды

Исследуемая поверхность	Результаты брожения на среде Кесслера	Результаты роста на среде Эндо	Микроскопирование	Вывод

Контрольные вопросы

1. Что такое санитарно-микробиологическое состояние объектов окружающей среды?
2. Как попадают патогенные микроорганизмы в окружающую среду?
3. Размножаются ли патогенные микроорганизмы на предметах окружающей среды?
4. Как долго сохраняют жизнеспособность патогенные микроорганизмы на предметах окружающей среды?
5. В каких местах мелкого производственного инвентаря микроорганизмы дольше сохраняют жизнеспособность?
6. Что такое шаблон и зачем он нужен?

Лабораторно-практическое занятие № 13

Выделение чистой культуры бактерий

Цель работы: выделение классическим методом чистой культуры бактерий из микрофлоры изучаемого объекта.

Оборудование и инструменты: стерильные чашки Петри, стерильная агаризованная питательная среда для культивирования бактерий, стерильная вода в колбе, стерильные пробирки с агаризованной средой в виде столбика и «косого агара», стерильные пробирки с поплавком с жидкой питательной средой, стерильные пробирки с поплавком с жидкой питательной средой с 1%-ным раствором KNO_3 , стерильные пробирки с поплавком с жидкой питательной средой с картофельным столбиком, пробирки с агаризованной средой, содержащей желатин, в виде столбика, плотная среда, содержащая крахмальный клейстер, стерильные пробирки с поплавком с жидкими питательными средами, содержащими сахара и индикаторы, стерильные пробирки с молоком, раствор йода, бактериальная петля, предметные стекла, красители, микроскоп, иммерсионное масло.

Методические указания. После объяснений преподавателя студенты конспектируют материал занятия и осваивают нижеизложенные методики, выполняя задания в соответствии с разделом «Задание для выполнения на занятии».

Для выявления микроорганизмов, находящихся на изучаемом объекте, определения их принадлежности к определенному семейству, роду, виду и изучения их свойств необходимо прежде всего изолировать отдельные виды микробов и выделить их в виде так называемых чистых культур.

Чистой культурой считается масса клеток, состоящая из микроорганизмов, которые принадлежат одному виду и получены как потомство одной клетки.

Известны различные способы выделения чистых культур микроорганизмов. Отличаются они в основном по приемам изолирования отдельных клеток из микробного сообщества. Изолирование можно производить путем разбавления микробной массы стерильной жидкостью, таким образом, чтобы в отдельно взятых каплях получаемой суспензии содержалось по одной клетке. Изолировать единичные клетки можно под микроскопом, используя специальный прибор - микроманипулятор. Вырастив такие изолированные клетки микроорганизмов в стерильной питательной среде, получают их потомство в виде чистых культур.

В микробиологической практике выделение чистых культур чаще производят методом *истощающего посева*. Существуют различные варианты изолирования и последующего выращивания микроорганизмов, однако суть методов сводится к следующему. На агаризованную расплавленную питательную среду в нескольких чашках Петри последовательно высевают уменьшающиеся количества исследуемого объекта с находящимися в нем микроорганизмами. При перемешивании питательной среды с внесенными в нее клетками микроорганизмов они отделяются друг от друга. В процессе застывания среды клетки фиксируются, каждая на своем месте.

При последующем культивировании посевов микроорганизмы размножаются, и на плотной среде в чашках Петри из каждой микробной клетки образуется масса клеток, называемая *колонией*. Колонии видимы невооруженным глазом или с помощью лупы. Каждая обособленная колония, представляя потомство одной клетки, является чистой культурой того вида, к которому принадлежала исходная клетка. Из колоний микроорганизмы пересевают в пробирки или чашки Петри со стерильной питательной средой, что и является завершающим этапом выделения чистых культур. Таким способом из смеси различных микроорганизмов, находящихся на том или ином объекте, удастся выделить отдельные виды аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов. Для выделения чистых культур строгих анаэробов посеvy выращивают в анаэробных условиях.

Далее выделенная чистая культура подлежит идентификации. **Идентификация** - определение систематического положения микроорганизмов. Для установления семейства, рода, вида, к которому принадлежат выделенные в чистые культуры бактерии и дрожжи, необходимо изучить их морфологические, культуральные и физиологические признаки. Морфологические признаки изучаются под микроскопом в препаратах живых и мертвых микроорганизмов. Культуральные признаки устанавливаются по характеру роста культуры изучаемого микроорганизма на плотных и жидких питательных средах. Физиологические признаки, обусловленные наличием различных ферментов в клетках, определяются при посеве в специальные среды, в состав которых входят вещества, возможность воздействия на которые выявляется у изучаемого микроорганизма. Проведя исследования морфологических, физиологических и культуральных признаков, устанавливают видовое название микроорганизма по определителю («ключу»). Для каждой группы мик-

роорганизмов (бактерий, дрожжей, грибов) существуют свои определители, составленные с учетом специфических особенностей данной группы.

Элективной (лат. *electus* - избранный) или накопительной, избирательной называется культура, обогащенная одним определенным видом или определенной физиологической группой микроорганизмов.

Изучая состав микрофлоры различных объектов путем выделения микроорганизмов в чистые культуры, не всегда удается выявить виды микробов, находящихся на изучаемом объекте в малых количествах. Они могут не попасть в чашки Петри с тем количеством посевного материала, которое берется для получения изолированных колоний. В таком случае применяют метод элективного культивирования микроорганизмов, создавая специфические условия культивирования, обеспечивающие преимущественное развитие представляющих интерес микроорганизмов. В процессе культивирования должны быть созданы условия, малопригодные или совсем неприемлемые для развития других сопутствующих микроорганизмов.

В соответствии со свойствами микроорганизмов, подбирается специфическая питательная среда, степень ее аэрации, температура, значение pH. В таких элективных условиях среда обогащается теми микроорганизмами, для которых эти условия являются наиболее благоприятными. Другие микроорганизмы в этих условиях совсем не развиваются или развиваются слабо. При культивировании микроорганизмов, например, при температуре 45-55 °С преимущественно развиваются термофильные бактерии. В питательной среде с повышенным содержанием поваренной соли можно накопить галофильные микроорганизмы. Создание анаэробных условий дает возможность вырастить только анаэробные микроорганизмы. Из таких элективных культур можно получить чистые культуры необходимых микроорганизмов классическими методами накопления, посевом в соответствующие агаризованные питательные среды.

Элективный метод выращивания применяется не только для получения накопительных культур микроорганизмов, но и для выявления присутствия и учета в изучаемом объекте определенных микроорганизмов, которые на стандартных питательных средах не растут, а если и растут, то их трудно отличить от других. В таких случаях посев проводится на дифференциально-диагностические среды. Чтобы выявить, например, протеолитические (разлагающие белки) микроорганизмы, изучаемый материал высевает на мясной бульон с желатином или на молочный агар в чашки Петри. После термостатирования на среде с желатином вокруг колоний протеолитических бактерий будет наблюдаться разжижение желатина, а на молочном агаре вокруг колоний таких бактерий образуются прозрачные зоны-ореолы (в результате пептонизации - «растворения» молочного белка), четко выделяющиеся на общем молочно-мутном фоне среды. Метод получения элективных культур был разработан русским ученым С. Н. Виноградским.

В зависимости от календарного плана лабораторных работ проводится исследование одной или нескольких элективных культур. Каждое задание

выполняется в течение двух лабораторных занятий: на первом - ставится опыт для накопления определенных бактерий, на втором - анализируются результаты. Получение любой элективной культуры проводится по единому плану.

Методика выполнения лабораторной работы

1. Сделать посев исследуемого материала в различных разведениях в чашки Петри. Исследуемый материал жидкой и полужидкой консистенции берется для посева в натуральном виде. Твердый исследуемый материал в небольшом количестве (для изучения качественного состава микрофлоры не обязательно брать определенную массу) переносится в емкость со стерильной водой и тщательно перемешивается. Может быть сделан смыв с изучаемой поверхности (площадь не ограничена). Количество исходного материала и воды для разведения можно взять произвольное. При посеве необходимо соблюдать правила асептики, т.е. правила предосторожности против вторичной контаминации исследуемого материала, стерильной питательной среды и чашек Петри посторонними микроорганизмами (из воздуха, с рук, соседних предметов). До застывания среды перемешать содержимое чашек осторожным вращением и оставить закрытые чашки до полного застывания среды.

2. На следующем занятии изучить выросшие на плотной питательной среде в чашках Петри колонии микроорганизмов и установить преобладающий тип. Для изучения колоний следует использовать только те чашки, в которых колонии располагаются изолированно друг от друга. Изучить культуральные признаки колоний. Выделить чистую культуру бактерий, преобладающих в исследуемом объекте. Колония не всегда является чистой культурой, она может образоваться не из одной, а из двух и даже из нескольких микробных клеток, случайно склеившихся в среде при посеве или оказавшихся близко расположенными друг к другу. В связи с этим следует проверить колонию, выбранную для выделения чистой культуры, на чистоту.

3. Проверку чистоты культуры производят путем микроскопирования бактерий в окрашенном препарате по однородности клеток. Окрашенный препарат приготовить способом «простой» окраски. При микроскопировании различных участков препарата необходимо сравнить клетки бактерий по форме, наличию спор, взаимному расположению клеток и другим морфологическим признакам. Сходство формы и размера клеток и спор (при их наличии) служит доказательством чистоты культуры. Следует иметь в виду, что при «простой» окраске бактерий споры их почти не окрашиваются.

4. После проверки колонии на чистоту сделать пересев бактериальной петлей бактерий в пробирку со стерильной плотной питательной средой, застывшей в виде скошенного столбика («косой» агар). Аккуратно, кончиком петли взять бактерии, слегка прикасаясь к выбранной колонии (следить, чтобы не задеть иглой близлежащие колонии).

5. На следующем занятии изучить рост бактерий. При описании роста отметить массивность налета (обильный, слабый или умеренный), характер

поверхности и окраску. Эти культуральные признаки используются при определении видового названия бактерий. Если налет неоднороден, то это указывает на загрязнение чистой культуры посторонними микроорганизмами (такую культуру изучать нельзя).

6. Изучить морфологические признаки бактерий: форму клеток, наличие спор, их форму и расположение в клетке; определить отношение к окраске по Граму; выявить подвижность бактерий, микроскопируя их в живом состоянии в препарате типа «раздавленная капля».

7. Для определения видовой принадлежности бактерий, кроме морфологических, надо определить физиологические и культуральные признаки. Для этого следует произвести посев бактерий (из чистой культуры) на различные питательные среды.

7.1. Отношение к кислороду определяется путем выращивания микроорганизмов в агаризованной питательной среде, которая приготовлена в пробирке в виде высокого столбика. Провести посев уколом. Для посева взять из культуры кончиком стерильной бактериологической иглы немного бактериальной массы и внести в столбик среды путем его прокола по центру на всю длину иглы. Далее иглу вынуть строго по линии прокола.

7.2. Способность разжижать желатин (разлагать белковые вещества) определяется при выращивании микроорганизмов в столбике желатин содержащей среды. Посев проводится уколом.

7.3. Способность осахаривать крахмал определяется при выращивании на плотной среде, содержащей крахмальный клейстер. Бактерии, взятые кончиком бактериологической иглы, нанести на поверхность среды в чашке Петри путем проведения нескольких «штрихов» (не разрыхляя плотной среды).

7.4. Способность восстанавливать нитраты определяется при выращивании микроорганизмов в питательном бульоне с 1%-ным раствором KNO_3 . Среда готовится в пробирке с поплавком. Из чистой культуры кончиком бактериологической иглы взять бактерии и занести в среду путем погружения в нее иглы.

7.5. Способность сбраживать сахара (глюкозу, сахарозу, лактозу) выявляется путем выращивания в среде (или в 1%-ной пептонной воде) с тем или иным сахаром (в количестве 1 %) и индикатором. Среда готовится в пробирках с поплавками. Посев в среды проводится аналогично п. 7.4.

7.6. Действие на молоко определяется путем выращивания микроорганизмов в стерильном обезжиренном молоке. Посев в пробирку с молоком проводится аналогично п. 7.4.

7.7. Осахаривание крахмала выявляется нанесением раствора йода в чашки Петри на поверхность плотной питательной среды с крахмалом около колоний бактерий. Посинение среды укажет на отсутствие фермента амилазы у бактерий, соответственно если крахмал осахарился, то посинение среды не произойдет.

Результаты проведенных исследований записать в таблице 20.

Биохимические свойства выделенных культур

№ культуры	Взаимодействие												
	желатин	крахмал	нитриты	глюкоза	сахароза	лактоза	мальтоза	маннит	молоко	Рост на МПБ	Рост на картофе- ле	Окраска по Граму	подвижность

8. Из культуральных признаков необходимо дополнительно выявить характер роста в питательном бульоне и на картофеле.

8.1. Характер роста в питательном бульоне (пленка и ее характер, осадок, помутнение). Отметить, имеются пленка и какая (нежная, толстая, морщинистая и др.), осадок и его характер (плотный, рыхлый, зернистый и др.), помутнение среды и степень его (слабое, сильное).

8.2. Характер роста на картофеле выявляется при выращивании микроорганизмов на скошенном кусочке стерильного картофеля. Бактерии посеять иглой на поверхность картофеля одним прямым «штрихом». Рост на картофеле охарактеризовать по массивности налета, его окраске и характеру поверхности.

9. На следующем занятии произвести анализ результатов опытов по выявлению физиологических и культуральных признаков бактерий. Ознакомиться с определением вида бактерий по определителю. При анализе результатов обратить внимание на следующее: аэробы развиваются только на поверхности столбика питательного агара; факультативные (условные) анаэробы развиваются по всей длине укола, сделанного в столбик.

Способность разжижать желатин свойственна лишь бактериям, которые имеют протеолитический фермент, вызывающий гидролиз желатина. При этом различные виды бактерий дают характерную для них форму разжижения: в виде воронки - воронковидное разжижение; в виде мешка - мешковидное; в виде ровного слоя - послойное. Бактерии, не обладающие данным ферментом, растут, не вызывая изменения желатина.

Способность осахаривать крахмал (амилолитическое, или диастатическое, действие) присуща бактериям, вырабатывающим фермент амилазу (диастаз). Под действием этого фермента происходит гидролиз крахмала. Способность восстанавливать нитраты (способность использовать в процессе дыхания связанный кислород) устанавливается по накоплению в среде (питательный бульон с KNO_3) нитритов и образованию газа (азота). Нитриты обнаруживаются с помощью качественной химической реакции добавлением в среду по 1-2 капли растворов серной кислоты, йодистого калия и крахмала.

При наличии нитритов среда синеет, так как в результате их взаимодействия с йодистым калием образуется свободный йод, реагирующий с крахмалом.

Способность сбраживать сахара выявляется по подкислению питательной среды и газообразованию. Одни бактерии, сбраживая сахара, образуют только органические кислоты, другие - не только кислоты, но и газ. Кислотообразование устанавливается по изменению цвета среды (покраснение) с помощью индикатора Андрее, введенного в среду до ее стерилизации, газообразование - по накоплению газа в поплавке. Действие на молоко в зависимости от свойства выращиваемых бактерий проявляется по-разному. При этом могут происходить следующие процессы: свертывание молока в результате накопления кислоты (за счет сбраживания лактозы) и образование более или менее плотного сгустка; при небольшом кислотообразовании свертывания может и не быть; свертывание молока за счет воздействия бактерий на белок (коагуляция) - так называемое сычужное свертывание. Оно происходит без изменения реакции среды или она становится слабощелочной, при этом сгусток получается слабый и выделяется сыворотка; пептонизация молока, т.е. гидролиз белков под влиянием протеолитических ферментов бактерий, проявляющаяся в виде просветления и легкого пожелтения молока; пептонизация может наступить после сычужного свертывания белков и без их свертывания. При оценке результатов опыта вначале выявить свертывание молока и пептонизацию. При отсутствии пептонизации индикатором метилрот (брать 1-2 капли) необходимо определить реакцию молока. Розовая окраска будет свидетельствовать о его подкислении.

8. После изучения морфологических, физиологических и культуральных признаков бактерий ознакомиться с определением вида (видового названия) бактерий по определителям, используя, например, «Определитель бактерий и актиномицетов» Н.А. Красильникова или «Определитель бактерий» Берджи. Работа с определителем бактерий аналогична проводимой на занятии при установлении родового названия гриба по «ключу».

Задание для выполнения на занятии

1. Законспектировать материал занятия.
2. Выполнить лабораторную работу в соответствии с методикой, зарисовывая рисунки и заполняя таблицы.

Контрольные вопросы

1. Что называется чистой культурой микроорганизмов?
2. Как выделяются чистые культуры микроорганизмов?
3. Какие приемы предосторожности против заражения исследуемого материала посторонними микроорганизмами используются при посевах?
4. Что такое колония микроорганизмов?
5. Любая ли колония бактерий может быть использована для выделения чистой культуры?
6. Как устанавливается чистота культуры бактерий?

7. Зачем производят посевы бактерий на различные питательные среды?

8. Какие изменения могут наблюдаться в молоке при развитии бактерий и как их объяснить?

Лабораторно-практическое занятие № 14

Выделение элективных культур молочнокислых и уксуснокислых бактерий

Цель работы: получение и изучение элективных культур молочнокислых и уксуснокислых бактерий.

Оборудование и инструменты: кисло-молочные продукты, четыре колбы с молоком по 50 мл³, бактериальная петля, предметные и покровные стекла, метиленовая синь, иммерсионное масло, 5%-ная уксусная кислота, непастеризованное пиво, краситель.

Методические указания. После объяснений преподавателя студенты конспектируют материал занятия и осваивают нижеизложенные методики, выполняя задания в соответствии с разделом «Задание для выполнения на занятии».

Молочнокислые бактерии вызывают процесс молочнокислого брожения, который состоит в разложении сахара с образованием молочной кислоты. Хорошей питательной средой для получения элективной культуры молочнокислых бактерий служит молоко. Если свежее молоко поставить в термостат при температуре 30-37 °С, то оно через сутки прокиснет за счет преимущественного развития в нем молочнокислых бактерий. В молоке могут развиваться и различные гнилостные бактерии, но развитие их подавляется за счет накопления молочной кислоты. Если взять пастеризованное молоко и заквасить его небольшим количеством какого-либо кисломолочного продукта (простокваши, сметаны) или чистой культурой молочнокислых бактерий и поставить в термостат, то прокисание молока наступит быстрее.

Уксуснокислые бактерии вызывают процесс уксуснокислого брожения, который заключается в окислении этилового спирта до уксусной кислоты и воды. Эти бактерии широко распространены в природе и встречаются на зрелых плодах, ягодах, в квашеных овощах, закисшем вине и пиве. Уксуснокислые бактерии - мелкие палочки, спор не образуют. Бывают неподвижные и подвижные. Они сапрофиты, аэробы, многие образуют пленки на поверхности жидкости, содержащей спирт. Оптимальная температура их развития 25-35 °С. По сравнению со многими другими бактериями они обладают большой устойчивостью к уксусной кислоте и этиловому спирту. Это их свойство используют для получения элективной культуры.

Методика выполнения лабораторной работы

1. Выделение элективной культуры молочнокислых бактерий

1.1 В две колбы (объемом около 50 см³) налить молоко приблизительно на $\frac{3}{4}$ их объема и закрыть ватными пробками. Одну колбу с молоком пастеризовать в течение 10 мин на водяной бане при температуре 80 °С, затем охладить до температуры 30 °С и добавить 10 мл кисломолочного продукта (ацидофилина, ряженки и др.). В случае использования чистых культур добавить их стерильной пипеткой в количестве 0,2-0,3 см³. Вторую колбу с молоком поставить для его прокисания в термостат с температурой 30 °С.

1.2 На следующем занятии сравнить микрофлору молока, заквашенного с использованием молочнокислых бактерий, и молока, подвергнувшегося прокисанию. Отметить консистенцию образовавшегося сгустка молока (плотная, сметанообразная), наличие сыворотки, пузырьков газа.

1.3 Изучить, сравнить и зарисовать микрофлору сквашенного молока из обеих колб. Для этого приготовить микроскопические препараты следующим образом: бактериологической петлей набрать каплю сыворотки, поместить ее на предметное стекло и распределить по нему; мазок высушить и фиксировать фламбированием; фиксированный препарат окрасить метиленовой синью в течение 2-3 мин, промыть водой, высушить и микроскопировать (с иммерсионным объективом). Бактерии окрашиваются интенсивно, белок молока - слабо.

1.4 При микроскопировании молока, заквашенного ацидофильной палочкой, выявить накопление длинных, тонких бесспорных палочек; в молоке, заквашенном термофильным стрептококком, - длинных цепочек кокков; в прокисшем молоке и молоке, заквашенном мезофильным стрептококком, - преобладание коротких цепочек или попарно соединенных кокков.

2. Выделение элективной культуры уксуснокислых бактерий

2.1 В две конические колбы объемом 50 см³ налить тонким слоем (1-1,5 см) питательную среду - непастеризованное пиво. В одну колбу добавить 1 см³ 5%-ной уксусной кислоты. Подкисление среды не будет препятствовать развитию уксуснокислых бактерий, но будет ограничивать рост посторонней микрофлоры, которая может также развиваться в пиве. В другой колбе пиво не подкислять (контроль). Колбы закрыть ватными пробками и поместить в термостат при температуре 30 °С.

2.2 На следующем занятии выявить накопление уксуснокислых бактерий по характерному для них культуральному признаку - образованию пленки на поверхности пива.

2.3 Установить накопление уксуснокислых бактерий микроскопированием. Приготовить для этого препараты сброженного пива (после его взбалтывания) из обеих колб, типа «раздавленная капля» и окрашенный «простым» способом. Установить форму клеток преобладающих бактерий, их подвижность, наличие или отсутствие спор. Отметить, присутствуют ли дрожжи и как велико их количество. Сопоставить результаты микроскопического исследования препаратов пива из обеих колб.

Задание для выполнения на занятии

1. Законспектировать материал занятия.
2. Выполнить лабораторную работу в соответствии с методикой, зарисовывая рисунки и заполняя таблицы.

Контрольные вопросы

1. Что такое элективная культура и как ее получают?
2. Как установить накопление уксуснокислых бактерий?

Лабораторно-практическое занятие № 15

Выделение элективной культуры гнилостных бактерий и протей

Цель работы: получение и изучение элективной культуры гнилостных микроорганизмов и протей.

Оборудование и инструменты: две стерильные колбы объемом 50 см³ с жидкой питательной средой, почва, индикаторы образования сероводорода и аммиака, целлофановая пленка, предметные стекла, покровные стекла, краситель, стерильные пробирки с агаризованной питательной средой со свежескошенным агаром, кусочек несвежего мяса, иммерсионное масло.

Методические указания. После объяснений преподавателя студенты конспектируют материал занятия и осваивают нижеизложенные методики, выполняя задания в соответствии с разделом «Задание для выполнения на занятии».

Гнилостные микроорганизмы вызывают сложный биохимический процесс разложения белковых веществ - гниение. Конечный результат его зависит от строения и состава белков, от условий, в которых протекает процесс, и от того, какие микроорганизмы его вызывают. Среди продуктов распада белковых веществ обнаруживаются аминокислоты, органические кислоты, спирты, сероводород, углекислый газ, аммиак, амины, меркаптаны, скатол, индол и целый ряд других веществ. Гнилостные бактерии широко распространены в природе и на различных пищевых продуктах. Видовой состав этой группы бактерий разнообразен. Есть аэробы и анаэробы, сбраживающие углеводы и не сбраживающие, спорообразующие и не образующие спор, подвижные и неподвижные. Развитие гнилостных бактерий на продуктах, богатых белками, обуславливает их порчу.

Протей - *Proteus vulgaris* (*Bad. vulgare*) широко распространен в природе, постоянно встречается в гниющих белковых продуктах. Он энергично разлагает белки с образованием неприятнопахнущих продуктов - индола, скатола, сероводорода. Сбраживает углеводы с образованием кислот и газов - углекислого и водорода. Относится к сапрофитам, факультативным анаэробам, имеет форму мелких палочек, не образует спор, не окрашивается по Граму. Оптимальная температура развития 37 °С, но он хорошо развива-

ется и при температуре 25 °С. Характерной особенностью протей является его чрезвычайная подвижность. Эту особенность используют для получения накопительной культуры протей - отделения его от сопутствующих бактерий, а также для выявления присутствия протей в различных объектах (метод Шукевича). Некоторые разновидности протей способны вырабатывать токсин. Употребление продуктов, содержащих большое количество этих микроорганизмов, может вызвать отравление.

Методика выполнения лабораторной работы

1. Получение и изучение элективной культуры гнилостных микроорганизмов

1.1 В конденсационную воду одной пробирки со «скошенным» агаром аккуратно опустить, не касаясь поверхности агара во избежание заражения его микроорганизмами, кусочек несвежего мяса размером примерно 3х3х3 мм. Для этого пробирку со «скошенным» агаром держать в горизонтальном положении так, чтобы агар находился сверху. Кусочек мяса взять пинцетом и поместить на нижнюю стенку пробирки, протолкнуть его бактериологической иглой почти до дна пробирки в конденсационную воду. Пробирку закрыть ватной пробкой и в вертикальном положении поставить в термостат при температуре 30 °С. Во вторую пробирку мясо не вносить и сохранить ее в холодильнике для последующей работы.

1.2. Через сутки на «скошенном» агаре разовьются бактерии. Протей благодаря активной подвижности будет быстрее других бактерий расти по поверхности «скошенного» агара, образуя в его верхней части характерный нежный стелющийся голубовато-серого цвета налет. Необходимо из самой верхней части налета сделать пересев бактерий (бактериологической петлей) в конденсационную воду «скошенного» агара пробирки № 2, не касаясь поверхности агара. Пробирку поставить в термостат при температуре 24 °С.

1.3 На следующем занятии выявить накопление протей по характерному для него культуральному признаку - по внешнему виду налета на «скошенном» агаре. Установить накопление протей микроскопическим путем. Для этого приготовить препарат типа «раздавленная капля», отметить форму клеток преобладающих бактерий, их подвижность. Приготовить препарат, окрашенный «простым» способом, определить наличие или отсутствие спор у микроорганизмов. Сравнить признаки преобладающих в препарате бактерий с признаками, характерными для протей: отметить наличие и относительное содержание других бактерий.

2. Получение и изучение элективной культуры протей

2.1 В пробирку со стерильным питательным бульоном внести немного почвы. Заккрыть пробирку ватной пробкой. При этом в целях выявления в дальнейшем некоторых продуктов распада белка (аммиака и сероводорода) под пробку заложить одним концом полоску влажной красной лакмусовой бумаги и полоску фильтровальной бумаги, смоченной раствором уксуснокислого свинца. Полоски бумаги должны помещаться в пробирку, не касаясь

ее стенок и среды. Пробирку поверх пробки закрыть целлофаном, либо надеть на нее резиновый колпачок для предохранения от улетучивания аммиака и сероводорода и поставить в термостат при температуре 30 °С.

2.2 На следующем занятии выявить накопление гнилостных бактерий по образованию ими в бульоне аммиака и сероводорода - характерных продуктов распада белка. Посинение лакмусовой бумажки свидетельствует о выделении аммиака. Если выделялся сероводород, то бумажка, смоченная уксуснокислым свинцом, почернеет (или побуреет) вследствие его превращения в сернокислый свинец черного цвета.

2.3 Микроскопировать развившиеся в бульоне бактерии. Приготовить препараты типа «раздавленная капля» и выявить наличие подвижных бактерий, приготовить препарат, окрашенный «простым» способом, установить форму клеток бактерий и наличие спор.

Задание для выполнения на занятии

1. Законспектировать материал занятия.
2. Выполнить лабораторную работу в соответствии с методикой, зарисовывая рисунки и заполняя таблицы.

Контрольные вопросы

1. Что такое гнилостные бактерии?
2. Какова форма клеток протей?
3. Обладает ли протей способностью к движению и спорообразованию?

Список литературы, рекомендуемой для подготовки к занятиям

Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Санитарно-эпидемиологические требования и нормативы. Сан-ПиН 2.3.21078-01. — М. : ФГУП «ИнтерСЭН», 2002. — 168 с.

ГОСТ 2874—82. Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством.

ГОСТ Р 50474—93. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечной палочки.

Ревель П. Среда нашего обитания. Загрязнение воды и воздуха. Кн. 2.: [пер. с англ.] / П. Ревель, Ч. Ревель. — М. : Мир, 1994. — 296 с.

Релленберг Г. Загрязнение природной среды. Введение в экологическую химию : [пер. с нем.] / Г. Релленберг. — М.: Мир, 1997. — 232 с.

Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды: Методические указания. МУК 4.2.1018—01. — М.: Федеральный центр Госсанэпид-надзора Минздрава России, 2001. — 42 с.

Экологическая микробиология / под ред. А. И. Нетрусова. — М.: Изд-во МГУ.

Кожевин П. А. Микробные популяции в природе / П. А. Кожевин — М • Изд-во МГУ, 1989.

Экология микроорганизмов / под ред. А. И. Нетрусова. — М. : Издательский центр «Академия», 2004. — С. 29 — 94.

Список использованной литературы

1. Гусев М.В. Микробиология / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. — Издательский центр «Академия», 2007.
2. Жарикова Г.Г., Леонова И.Б. Основы микробиологии. Практикум. - Издательский центр «Академия», 2008.
3. Жарикова Г.Г. Микробиология продовольственных товаров. Санитария и гигиена / Г.Г. Жарикова. — М.: Издательский центр «Академия», 2005.
4. Коротяев А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология / А.И. Коротяев, С.А. Бабичев. — СПб.: СпецЛит, 2002.
5. Мудрецова – Висс К.А. руководство к лабораторным занятиям по микробиологии: учебное пособие / К.А. Мудрецова – Висс, С.А. Колесник, Т.И. Гринюк. — М.: Экономика, 1975.
6. Оценка загрязненности пищевых продуктов микотоксинами. Т.3 / под ред. В.А. Перетрухина. — М.: (б.и.), 1985.
7. Перетрухина А.Т. Микробиология сырья и продуктов водного происхождения / А.Т. Перетрухина. — М.: ГИОРД, 2005.
8. Тутельян В.А. Микотоксины / В.А. Тутельян, Л.В. Кравченко. — М.: Медицина, 1985.

Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Меркулов А.В., Лыдина М.А.

**РУКОВОДСТВО К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ
по дисциплине
«ОСНОВЫ МИКРОБИОЛОГИИ»**

Подписано в печать

Формат Печать офсетная

Усл.п.л. Тираж экз. Заказ

432980 г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1