

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

Л.В. Красникова, П.И. Гунькова

ОБЩАЯ И ПИЩЕВАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Часть I

Учебное пособие



Санкт-Петербург

2016

УДК 579.2
ББК 28.4
К 78

Красникова Л.В., Гунькова П.И. Общая и пищевая микробиология: Учеб. пособие. Часть I. – СПб.: Университет ИТМО, 2016. – 134 с.

Рассматриваются вопросы общей микробиологии, дается понятие об организации микробиологической лаборатории, методах стерилизации микробиологических объектов, а также санитарно-гигиенического контроля воздуха производственных помещений, питьевой воды и пищевых продуктов.

Предназначено для студентов бакалавриата очной и заочной форм обучения направлений 19.04.01 Биотехнология, 19.04.02 Продукты питания из растительного сырья и 19.04.03 Продукты питания животного происхождения по дисциплинам «Общая и пищевая микробиология» и «Общая биология и микробиология».

Рецензенты: кафедра химии и биотехнологии ФПБОУ Санкт-Петербургского торгово-экономического университета (зав. кафедрой доктор техн. наук, доц. Ю.Г. Базарнова); кандидат техн. наук, М.М. Шамцян (кафедра технологии микробиологического синтеза Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета))

Рекомендовано к печати Советом факультета пищевых биотехнологий и инженерии, протокол № 2 от 28.10.2015 г.



Университет ИТМО – ведущий вуз России в области информационных и фотонных технологий, один из немногих российских вузов, получивших в 2009 году статус национального исследовательского университета. С 2013 года Университет ИТМО – участник программы повышения конкурентоспособности российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров, известной как проект «5 – 100». Цель Университета ИТМО – становление исследовательского университета мирового уровня, предпринимательского по типу, ориентированного на интернационализацию всех направлений деятельности.

© Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, 2016

© Красникова Л.В., Гунькова П.И., 2016

ВВЕДЕНИЕ

Учебное пособие содержит информацию, необходимую для подготовки студентов к практической работе в микробиологической лаборатории. Основной целью пособия является ознакомление студентов с наиболее важными приемами и методами микробиологических исследований, которые необходимы при изучении дисциплины «Общая и пищевая микробиология».

Каждый раздел пособия содержит основные теоретические пояснения по изучаемой теме, цель исследования, описание методики постановки опыта, перечень контрольных вопросов для самопроверки.

Пособие предусматривает приобретение студентами нижеперечисленных теоретических знаний и навыков:

- изучение устройства биологического микроскопа и техники приготовления микроскопических препаратов;
- ознакомление со специальными методами микроскопических исследований (темнопольная, фазово-контрастная и электронная микроскопия);
- ознакомление с оборудованием микробиологической лаборатории и способами стерилизации питательных сред, посудой, инвентарем;
- изучение морфологии важнейших групп микроорганизмов, влияющих на качество пищевых продуктов;
- освоение методов количественного учета микроорганизмов в объектах внешней среды и продуктах питания.

При проведении микробиологических работ очень важным является соблюдение условий стерильности, поэтому в первых разделах пособия дано описание физических и механических методов стерилизации и химических средств дезинфекции.

В учебном пособии большое внимание уделено морфологии бактерий, дрожжей и мицелиальных грибов. Дана характеристика основных видов бактерий – возбудителей порчи пищевых продуктов. Детально рассмотрено строение основных видов дрожжей и плесневых грибов, развивающихся в продуктах питания. Материал нескольких тем лабораторного практикума посвящен микробиологическому исследованию воздуха помещений, питьевой воды и пищевых продуктов. Освещены также вопросы микрофлоры воды, санитарных

требований к качеству питьевой воды. Дано понятие о санитарно-показательных микроорганизмах и методах их определения.

В приложении приведены рецептуры основных питательных сред, используемых в микробиологической практике.

Правила работы в микробиологической лаборатории

Специфика работы в микробиологической лаборатории требует строгого соблюдения порядка и чистоты. В связи с этим при работе в лаборатории студенты должны соблюдать следующие правила:

- 1) запрещается входить в лабораторию в верхней одежде, головном уборе, вносить посторонние вещи;
- 2) запрещается находиться в лаборатории в период обработки воздуха помещения ультрафиолетовыми лампами;
- 3) перед занятиями необходимо надеть хлопчатобумажный халат;
- 4) не разрешается выходить в халате за пределы лаборатории и надевать на халат верхнюю одежду;
- 5) нельзя класть на лабораторный стол личные вещи (сумки, папки и др.), их следует держать в специально отведенных местах;
- 6) в лаборатории запрещается принимать пищу, пить воду, не допускаются излишние разговоры и хождения;
- 7) на лабораторном столе не должно быть никаких лишних предметов, не имеющих отношения к работе;
- 8) соблюдать осторожность при работе с открытым огнем спиртовки или газовой горелки;
- 9) во избежание распыления спор микроорганизмов не допускается оставлять открытыми чашки Петри, пробирки, колбы с культурами плесневых грибов, часто являющихся аллергенами;
- 10) использованные пипетки, предметные и покровные стекла следует опускать в раствор с дезинфицирующей жидкостью;
- 11) в конце занятий следует привести в порядок рабочее место: поставить на место микроскоп, вымыть посуду, протереть рабочий стол и поставить под него табуретку;
- 12) дежурному по группе проверить рабочие места студентов.

1. МИКРОСКОПИЯ

Изучение клеток микроорганизмов, не видимых невооруженным глазом, возможно только при помощи микроскопов (от греч. *mīcros* – малый, *skopeo* – смотрю). Эти приборы позволяют получать изображение исследуемых объектов, увеличенное в сотни раз (световые микроскопы) и в десятки – сотни тысяч раз (электронные микроскопы).

1.1. Устройство светового микроскопа

Цель работы: ознакомить студентов с устройством светового микроскопа, его характеристиками и правилами работы с ним.

Микроскоп называется световым, так как он обеспечивает возможность изучать объект в проходящем свете. Основными элементами современных световых микроскопов являются механическая и оптическая части (рис. 1.1).

К механической части относятся штатив, тубус, револьверная насадка, коробка микромеханизма, предметный столик, макрометрический и микрометрический винты.

Штатив состоит из двух частей – основания и тубусодержателя (колонки). **Основание** микроскопа прямоугольной формы, имеет снизу четыре опорные площадки, что обеспечивает устойчивое положение микроскопа на поверхности рабочего стола.

Тубусодержатель соединяется с основанием и может перемещаться в вертикальной плоскости при помощи макро- и микрометрического винтов. При вращении винтов по часовой стрелке тубусодержатель опускается, при вращении против часовой стрелки – поднимается от препарата. В верхней части тубусодержателя укреплена **головка** с гнездом для монокулярной (или бинокулярной) насадки и направляющей для револьверной насадки. Головка крепится **винтом**.

Тубус – это труба микроскопа, позволяющая поддерживать определенное расстояние между основными оптическими деталями – окуляром и объективом. Вверху в тубус вставляется окуляр. Современные модели микроскопов имеют наклонный тубус.

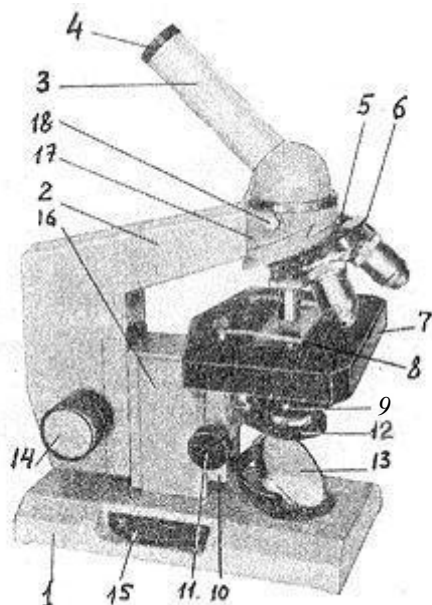


Рис. 1.1. Устройство микроскопа:

- 1 – основание; 2 – тубусодержатель; 3 – тубус; 4 – окуляр;
 5 – револьверная насадка; 6 – объектив; 7 – предметный столик;
 8 – клеммы, прижимающие препарат; 9 – конденсор;
 10 – кронштейн конденсора; 11 – рукоятка перемещения конденсора;
 12 – откидная линза; 13 – зеркало; 14 – макровинт; 15 – микровинт;
 16 – коробка с механизмом микрометрической фокусировки;
 17 – головка для крепления тубуса и револьверной насадки;
 18 – винт для крепления головки

Револьверная насадка представляет собой вогнутый диск с несколькими гнездами, в которые ввинчиваются 3–4 объектива. Вращая револьверную насадку, можно под отверстие тубуса быстро установить любой объектив в рабочее положение.

Коробка микромеханизма несет с одной стороны направляющую для кронштейна конденсора, а с другой – направляющую для тубусодержателя. Внутри коробки находится механизм фокусировки микроскопа, представляющий собой систему зубчатых колес.

Предметный столик служит для размещения на нем препарата или другого объекта исследования. Столик может быть квадратным или круглым, подвижным или неподвижным. Подвижный столик перемещается в горизонтальной плоскости при помощи двух боковых винтов, что позволяет рассматривать препарат в разных полях зрения. На неподвижном столике для обследования объекта в разных полях зрения препарат перемещают рукой. Снизу в центре предмет-

ного столика имеется отверстие для освещения лучами света, направляемыми от осветителя. На столике имеются две пружинные **клеммы**, предназначенные для закрепления препарата. Некоторые системы микроскопов снабжены препаратоводителем, необходимым при исследовании поверхности препарата или при подсчете клеток. Препаратоводитель позволяет производить передвижение препарата в двух взаимноперпендикулярных направлениях. На препаратоводителе имеется система линеек – нониусов, с помощью которых можно сообщить координаты любой точке исследуемого объекта.

Макрометрический винт (макровинт) служит для предварительной ориентировочной установки изображения рассматриваемого объекта. При вращении макровинта по часовой стрелке тубус микроскопа опускается, при вращении против часовой стрелки – поднимается.

Микрометрический винт (микровинт) используют для точной установки изображения объекта. Микрометрический винт является одной из наиболее легко повреждаемых частей микроскопа, поэтому с ним надо обращаться осторожно: во избежание самопроизвольного опускания тубуса не вращать винт с целью грубой установки изображения. При полном повороте микровинта тубус передвигается на 0,1 мм.

Оптическая часть микроскопа состоит из основных оптических деталей (объектива и окуляра) и вспомогательной осветительной системы (зеркала и конденсора).

Объективы (от лат. *objektum* – предмет) – наиболее важная, ценная и хрупкая часть микроскопа. Они представляют собой систему линз, заключенных в металлическую оправу, на которой указаны степень увеличения и числовая апертура. Наружная линза, обращенная плоской стороной к препарату, называется фронтальной. Именно она обеспечивает увеличение. Остальные линзы называются коррекционными и служат для устранения недостатков оптического изображения, возникающих при рассмотрении исследуемого объекта.

Объективы бывают сухие и иммерсионные, или погружные. *Сухим* называется объектив, у которого между фронтальной линзой и рассматриваемым объектом находится воздух. Сухие объективы обычно имеют большое фокусное расстояние и увеличение 8х или 40х. *Иммерсионным* (погружным) называют объектив, у которого между фронтальной линзой и препаратом находится специальная жидкая среда. Вследствие разницы между показателями преломления стекла (1,52) и воздуха (1,0) часть световых лучей преломляется и не

попадает в глаз наблюдателя. В результате этого изображение получается нечетким, более мелкие структуры остаются невидимыми. Избежать рассеивания светового потока можно путем заполнения пространства между препаратом и фронтальной линзой объектива веществом, показатель преломления которого близок к коэффициенту преломления стекла. К таким веществам относятся глицерин (1,47), кедровое масло (1,51), касторовое (1,49), льняное (1,49), гвоздичное (1,53), анисовое (1,55) и др. Иммерсионные объективы имеют на оправе обозначения: **I** – *immersion* (иммерсия), **HI** – *Homogen immersion* (однородная иммерсия), **OI** – *oil immersion* и **MI** – масляная иммерсия. В настоящее время в качестве иммерсионной жидкости чаще используют синтетические продукты, соответствующие по оптическим свойствам кедровому маслу.

Объективы различают по их увеличению. Величина увеличения объективов обозначена на их оправе (8х, 40х, 60х, 90х). Кроме того, каждый объектив характеризуется определенной величиной рабочего расстояния. Для иммерсионного объектива это расстояние соответственно составляет 0,12 мм, для сухих объективов с увеличением 8х и 40х – 13,8 и 0,6 мм.

Окуляр (от лат. *okularis* – глазной) состоит из двух линз – глазной (верхней) и полевой (нижней), заключенных в металлическую оправу. Окуляр служит для увеличения изображения, которое дает объектив. Увеличение окуляра обозначено на его оправе. Существуют окуляры с рабочим увеличением от 4х до 15х.

При длительной работе с микроскопом следует пользоваться бинокулярной насадкой. Корпуса насадки могут раздвигаться в пределах 55–75 мм в зависимости от расстояния между глазами наблюдателя. Бинокулярные насадки часто имеют собственное увеличение (около 1,5х) и коррекционные линзы.

Конденсор (от лат. *condenso* – уплотняю, сгущаю) состоит из 2–3 короткофокусных линз. Он собирает лучи, идущие от зеркала, и направляет их на объект. При помощи рукоятки, расположенной под предметным столиком, конденсор может перемещаться в вертикальной плоскости, что приводит к увеличению освещенности поля зрения при поднятом конденсоре и уменьшению его при опущенном конденсоре. Для регулировки интенсивности освещения в конденсоре имеется ирисовая (лепестковая) диафрагма, состоящая из стальных серповидных пластинок. При полностью открытой диафрагме реко-

мендуется рассматривать окрашенные препараты, при уменьшенном отверстии диафрагмы – неокрашенные. Под конденсором расположена **откидная линза** в оправе, используемая при работе с объективами малого увеличения, например, 8х или 9х.

Зеркало имеет две отражающие поверхности – плоскую и вогнутую. Оно закреплено на шарнирах в основании штатива, и его можно легко поворачивать. При искусственном освещении рекомендуется пользоваться вогнутой стороной зеркала, при естественном – плоской.

Осветитель выполняет функцию искусственного источника света. Он состоит из низковольтной лампы накаливания, закрепляющейся на штативе, и понижающего трансформатора. На корпусе трансформатора имеется рукоятка реостата, регулирующего накал лампы, и тумблер для включения осветителя.

Во многих современных микроскопах осветитель вмонтирован в основание.

1.2. Основные характеристики светового микроскопа

Числовая апертура A (от лат. *aperture* – отверстие) объектива характеризует его светособирательную способность и определяется по формуле

$$A = n \sin \frac{1}{2} \alpha,$$

где n – показатель преломления светового луча, проходящего через предметное стекло в среду между фронтальной линзой объектива и предметным стеклом; α – угол, одна сторона которого совпадает с оптической осью, а другая образована линией, соединяющей точку выхода эффективных лучей из объектива с границей действующего отверстия объектива; $\frac{1}{2} \alpha$ – половинный угол входного отверстия объектива.

Важно, чтобы значение величины n было максимальным. Повысить его можно введением в пространство между фронтальной линзой объектива и предметным стеклом вещества с показателем преломления, близким к показателю преломления стекла, как это сказано выше. Не менее важно также, чтобы значение величины $\sin \frac{1}{2} \alpha$ было максимальным. Предел повышения этого значения зависит от степени кривизны фронтальной линзы иммерсионного объектива и числовой апертуры конденсора. Следует помнить, что повысить ве-

личину $\sin \frac{1}{2} \alpha$ при использовании иммерсионных объективов можно максимальным поднятием конденсора, что определяется его светособирательной функцией. Если конденсор опущен, то функция, по существу, нарушена.

Числовая апертура и увеличение объектива обозначены на его оправе: 8х0,2; 40х0,65; 90 х1,25.

Увеличительная способность микроскопа (D) определяется произведением увеличения окуляра (K) на увеличение объектива (V):

$$D = KV.$$

Теоретически микроскоп может дать увеличение х2000 раз и более. Однако следует различать полезное и бесполезное увеличение микроскопа. Увеличение, которое дает возможность рассматривать объект под предельным углом зрения, и есть полезное увеличение. Пределы полезного увеличения в обычных световых микроскопах достигают 1400. При превышении границ полезного увеличения возникают дифракция и другие явления, обусловленные волновой природой света. В частности, у объектива с увеличением 40х и числовой апертурой 0,65 полезное увеличение составляет 325–650. Такое увеличение позволяет различить все структуры, разрешаемые данным объективом. Поэтому для получения разрешения в пределах полезного при работе с объективом 40х следует брать окуляр 15х. Применение более сильных окуляров не даст возможности выявить более тонкие детали.

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

Разрешающая способность микроскопа. Если увеличительная способность микроскопа зависит от объектива и окуляра, то разрешающая способность определяется, в основном, объективом и конденсором. Разрешающую способность рассчитывают по формуле

$$d = \lambda / 2A,$$

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

Максимальная разрешающая способность светового микроскопа составляет 0,2 мкм. Разрешающая способность микроскопа тем лучше, чем меньше абсолютная величина d .

1.3. Правила работы с микроскопом

1. Микроскоп берут одной рукой за колонку штатива, а другой поддерживают за основание. Брать и поднимать микроскоп за другие детали категорически запрещается.

2. На рабочем столе микроскоп помещают колонкой к себе. Перед началом работы следует осторожно удалить пыль с оптических частей микроскопа мягкой сухой тканью, не касаясь пальцами линз.

3. С помощью револьверной насадки устанавливают нужный объектив. Характерный щелчок фиксатора внутри револьвера свидетельствует о центрированном положении объектива. Необходимо помнить, что, чем меньше увеличение объектива, тем больше фокусное расстояние. При работе с объективом 8х расстояние между препаратом и объективом около 9 мм, с объективом 40х оно составляет 0,6 мм, и с объективом 90х – около 0,15 мм.

4. На предметный столик помещают предметное стекло и закрепляют его клеммами.

5. Тубус микроскопа опускают вниз с помощью макрометрического винта осторожно, наблюдая за объективом сбоку, и приближают к препарату (не касаясь его) на расстояние, меньшее рабочего. Затем, глядя в окуляр, медленным вращением макровинта поднимают тубус до тех пор, пока в поле зрения не появится изображение изучаемого предмета.

6. Вращением микрометрического винта объектив фокусируют таким образом, чтобы изображение предмета было четким.

7. При работе с иммерсионным объективом на предметное стекло наносят каплю кедрового масла и, глядя сбоку на объектив, макрометрическим винтом осторожно опускают тубус так, чтобы фронтальная линза объектива погрузилась в масло. Затем, глядя в окуляр, медленным движением макровинта поднимают тубус до тех пор, пока не появится изображение. Для точной фокусировки пользуются микрометрическим винтом, который вращают в пределах одного оборота.

В н и м а н и е ! Запрещается искать изображение препарата с помощью микрометрического винта.

8. Препарат рассматривают в нескольких полях зрения, передвигая предметный столик при помощи боковых винтов, или перемещают его рукой на предметном столике. Находят наиболее подхо-

дящее поле зрения на участке препарата, на котором микроорганизмы видны отчетливо, в достаточном для просмотра количестве, и зарисовывают микроскопическую картину.

9. При смене объективов следует регулировать интенсивность освещения рассматриваемого объекта. Желаемую степень освещения получают, опуская или поднимая конденсор.

10. По окончании работы поднимают тубус, снимают препарат с предметного столика, удаляют масло с фронтальной линзы иммерсионного объектива фильтровальной бумагой, смоченной бензином, устанавливают при помощи револьверной насадки объектив с увеличением 8х, кладут на предметный столик кусочек чистой марли и опускают тубус.

1.4. Микроскопия в темном поле

Микроскопия в темном поле позволяет увеличить разрешающую способность объектива примерно в 10 раз и рассмотреть объекты, размеры которых находятся за пределами обычного микроскопа. Темнопольная микроскопия основана на освещении объекта косыми лучами света, которые не попадают в объектив и остаются невидимыми для глаза (явление Тиндаля). Поэтому поле зрения выглядит совершенно черным. Если препарат содержит какие-либо частицы, например микроорганизмы, то косые лучи, направленные под определенным углом, вследствие дифракции отражаются от их поверхности и настолько отклоняются от своего начального направления, что попадают в объектив. Поскольку лучи света идут именно от объекта, то наблюдатель видит на черном фоне характерное светящееся изображение контуров микробных клеток или других частиц. Темное поле зрения достигается применением специального конденсора, которым заменяют обычный конденсор светового микроскопа. Однако эффект темного поля может быть достигнут лишь в том случае, если апертура конденсора превышает апертуру объектива на 0,2–0,4 единицы.

Темнопольную микроскопию используют для изучения живых клеток микроорганизмов. Она применяется для наблюдения за подвижностью микробов, обнаружения возбудителей некоторых болезней (лептоспироза). Однако к темном полю зрения нельзя хорошо изучить форму и внутреннее строение микробной клетки.

При рассмотрении дрожжевых клеток цитоплазма опалесцирует слабо и равномерно, на ее фоне отчетливо выделяются черные вакуоли, сильно блестящие гранулы липосом. Протопласт отмирающих клеток имеет молочно-белую окраску.

1.5. Фазово-контрастная микроскопия

Фазово-контрастная микроскопия дает возможность рассматривать живые объекты без окрашивания и фиксирования. Глаз человека реагирует на изменения длины световой волны (цвет) и ее амплитуды (интенсивность, контрастность), но не воспринимает различий по фазе. Метод фазово-контрастной микроскопии разработан для наблюдения за прозрачными объектами, которые пропускают лучи одинаковой длины и амплитуды, но смещают их фазу. Величина смещения зависит от толщины и показателя преломления структур. С помощью фазово-контрастного устройства фазовые изменения световых волн, проходящих через прозрачные объекты, превращаются в амплитудные, благодаря чему детали рассматриваемых объектов становятся хорошо видимыми глазом и контрастными.

Для проведения исследований в дополнение к световому микроскопу следует иметь фазово-контрастное устройство. Наиболее широко применяется модель КФ-4, состоящая из вспомогательного микроскопа, специальных фазовых объективов и конденсора с набором кольцевых диафрагм, каждая из которых соответствует фазовой пластинке определенного объектива.

Вспомогательный микроскоп устанавливают, заменяя окуляр обычного микроскопа. Для получения фазового контраста в объектив вводится специальная фазовая пластинка, которая представляет собой тонкий диск с напылением из солей редких металлов на одну из внутренних линз объектива. Она изменяет фазу проходящей световой волны на $\frac{1}{4} \lambda$, что приводит к превращению фазовых различий в амплитудные. На оправе фазовых объективов обозначены индексы: Ф10, Ф20, Ф40 и Ф90. Кольцевые диафрагмы установлены в револьверном диске под конденсором и поворотом диска могут быстро меняться. Кольцевая диафрагма пропускает через конденсор в плоскость препарата лишь кольцо света. Эффект фазового контраста получают путем точного совмещения кольца фазовой пластинки с проекцией кольцевой диафрагмы.

1.6. Люминесцентная микроскопия

Применение люминесцентной микроскопии основано на свойстве некоторых биологических объектов светиться при их облучении невидимыми для человеческого глаза коротковолновыми лучами (сине-фиолетовыми с длиной волны около 460 нм или ультрафиолетовыми с длиной волны 300–400 нм). Такое явление объясняется тем, что часть энергии падающего света поглощается и освещаемый объект испускает лучи, имеющие большую длину волны, чем лучи возбуждающего света. При этом клетки светятся желто-зеленым или оранжевым светом (флуоресцируют). Это собственная или первичная люминесценция.

Первичным свечением обладают клетки растений и водорослей благодаря наличию хлорофилла, а также некоторые бактерии, вырабатывающие пигмент. Большинство клеток микроорганизмов обладает слабой первичной люминесценцией.

Вторичная (или наведенная) люминесценция объектов, не обладающих собственной люминесценцией, достигается их обработкой специальными красителями – флуорохромами. Наиболее широко используются флуорохромы акридиновой и тиазоловой групп (акридин оранжевый и желтый, аурамин, уранин, родамин, тиофлавин, примулин, флуоресцин и др.). В частности, акридин оранжевый окрашивает цитоплазму в зелено-желтый, метакроматин – в ярко-красный, вакуоли – в розовый, ядро – в светло-зеленый цвет.

Люминесцентная микроскопия осуществляется в затемненной комнате с помощью специального люминесцентного микроскопа, например, МЛ-2.

В качестве источника ультрафиолетового излучения в люминесцентных микроскопах используются специальные кварцевые лампы. Прежде чем попасть на объект, лучи лампы проходят через ряд светофильтров, пропускающих только определенную часть ультрафиолетового спектра с $\lambda = 360\text{--}380$ нм.

Более доступным способом возбудителя люминесценции является использование коротковолновой части видимого света – сине-фиолетовых лучей с $\lambda = 460$ нм. В этом случае наблюдения можно проводить не только в специальном люминесцентном микроскопе, но и с помощью обычного микроскопа, установив на пути лучей синий стеклянный или жидкий светофильтр. Излишние синие лучи убирают

желтым светофильтром, который помещают на окуляр микроскопа. В результате в препарате на черном фоне видны люминесцирующие объекты.

Люминесцентная микроскопия позволяет наблюдать морфологические особенности объектов, которые при обычной микроскопии лежат за пределами видимости. Кроме того, она дает возможность дифференциации вида микробов по характеру свечения, изучения изменения структур при различных физиологических состояниях клетки. Этот метод позволяет изучать антигенную структуру бактерий и обнаруживать возбудителей инфекционных заболеваний путем применения меченных люминесцентными красками иммунных сывороток.

1.7. Электронная микроскопия

В электронном микроскопе вместо световых лучей используется поток движущихся электронов, что позволяет увеличить разрешающую способность прибора в 100 раз и более. Высокая разрешающая способность современных электронных микроскопов дает возможность наблюдать и изучать объекты, которые невидимы в световом микроскопе: вирусы, бактериофаги, микоплазмы, тонкое строение клеток прокариот и эукариот, их макро- и микроструктурные элементы.

Электронный микроскоп состоит из нескольких сложных узлов:

1. Колонна, в которой смонтированы электронная пушка, устройства, фокусирующие пучок электронов, конденсорная линза, камера объекта (предметный столик, объективная, промежуточная и проекционная линзы); флюоресцирующий экран, фотокамера.
2. Вакуумная установка, позволяющая создавать в колонне высокий вакуум.
3. Пульт управления.
4. Установка для электропитания, размещенная в металлическом шкафу за колонной.
5. Вспомогательные устройства.

Осветительная система электронного микроскопа состоит из электронной пушки и конденсорной линзы. В качестве линз, фокусирующих пучок электронов, используется электромагнитное поле

(стеклянные линзы употреблять нельзя, так как стекло непроницаемо для электронов). Воздух препятствует движению электронов, поэтому внутри микроскопа необходимо поддерживать вакуум.

Техника подготовки препаратов для электронной микроскопии существенно отличается от той, которая используется для рассмотрения в световом микроскопе. Препараты для просматривания в электронном микроскопе готовят на очень тонкой, проницаемой для электронов подложке. В качестве подложки применяют пленки из коллодия, кварца или других материалов толщиной около 1 мкм. В связи с тем, что пленки очень тонкие и непрочные, их помещают на специальные металлические сетки с мелкими ячейками. Общая толщина препарата и подложки должна быть не более 0,25 мкм. С целью повышения контрастности изучаемых препаратов их подвергают дополнительной обработке в условиях глубокого вакуума путем напыления на них чрезвычайно тонкого слоя хрома, золота, платины или палладия или используют различные контрастирующие вещества (уранилацетат, уранилнитрат, фосфорновольфрамовую кислоту). Рассматриваемый объект помещают на предметный столик, находящийся между конденсором и объективной линзой. Проходя через исследуемый объект, пучок электронов рассеивается и фокусируется в электромагнитном преломляющем поле объективной линзы. Получается первое увеличенное действительное изображение объекта (в 40–50 тыс. раз), наблюдаемое через смотровое стекло. Затем поток электронов попадает в электромагнитное поле проекционной линзы, которая конденсирует пучок проходящих электронов и фокусирует их на флюоресцирующем экране, давая окончательное увеличенное изображение объекта в 200–300 тыс. раз.

Под флюоресцирующим экраном находится фотокамера. Приподнимая специальной рукояткой экран, пропускают пучок электронов на фотопластинку и фотографируют изображение объекта.

Контрольные вопросы

1. Каковы основные правила работы в микробиологической лаборатории?
2. Назовите основные элементы механической части микроскопа.
3. Назовите основные элементы оптической части микроскопа.

4. Что такое числовая апертура микроскопа?
5. Чем отличаются сухие объективы от иммерсионных?
6. Каково назначение макро- и микрометрического винтов?
7. Для чего нужна револьверная насадка?
8. Как определить увеличительную способность микроскопа?
9. Как регулировать степень освещенности препарата?
10. Назовите основные характеристики светового микроскопа.
11. В чем заключается сущность микроскопии в темном поле?
12. Поясните принцип работы фазово-контрастного микроскопа.
13. Объясните принцип работы люминесцентного микроскопа.
14. Каковы особенности работы с электронным микроскопом?

2. ОРГАНИЗАЦИЯ И ОБОРУДОВАНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Цель работы: ознакомить студентов с оборудованием микробиологической лаборатории, методами и средствами стерилизации питательных сред, посуды, инвентаря.

Микробиологическая лаборатория должна включать следующие помещения:

- лабораторные комнаты для проведения исследований;
- застекленный бокс для выполнения работ, требующих соблюдения повышенной стерильности;
- моечную, оборудованную для мытья посуды;
- препараторскую, приспособленную для приготовления питательных сред, подготовки посуды для стерилизации, приготовления реактивов;
- отделение для стерилизации, в котором установлены автоклавы.

Все помещения лаборатории должны иметь хорошее естественное и искусственное освещение. Поверхность столов и полы покрывают легко моющимся материалом (пластик, линолеум); в боксе, автоклавной и моечной стены и полы покрывают плиткой. Для стерилизации воздуха в помещениях лаборатории устанавливают бактерицидные лампы (БУВ-15, БУВ-30 и др.).

Оборудование: автоклавы, термостаты, шкафы сухожаровые, микроскопы, холодильники, весы технические, аппарат для микробиологического анализа воздуха помещений, прибор для подсчета колоний микроорганизмов, анаэроустат для культивирования анаэробных бактерий, рН-метр.

Посуда и инвентарь: петли и иглы бактериологические, шпатели Дригальского, ножницы, пинцеты, штативы, посуда лабораторная (чашки Петри, пробирки, пипетки – чаще всего на 1,0 и 0,1 см³, предметные и покровные стекла, флаконы для красок и растворов), вата, марля, фильтровальная бумага.

2.1. Методы и средства стерилизации, применяемые в микробиологической практике

Стерилизация (от лат. *sterilis* – бесплодный) в микробиологической практике и пищевой промышленности означает уничтожение

в материалах всех вегетативных клеток микроорганизмов и их спор. Стерилизация является одним из важнейших и необходимых приемов в микробиологической практике.

Существуют следующие способы стерилизации:

Термическая стерилизация

- прокаливание в пламени (фламбирование);
- кипячение;
- сухой жар;
- насыщенный пар под давлением;

Холодная стерилизация

- фильтрование;
- облучение;

Дезинфекция.

Термическая стерилизация

Фламбирование – стерилизация путем прокаливания мелких предметов в пламени спиртовки или горелки (предметные стекла, бактериологические петли, иглы, пинцеты, ланцеты и т.п.). В пламени обжигают также горлышки колб, пробирок при пересевах культур и розливе питательных сред.

Кипячение применяют для стерилизации металлических инструментов, игл, резиновых трубок. Инструменты кипятят в специальных металлических стерилизаторах с крышками в течение 30–40 мин. Однако даже весьма продолжительное кипячение не обеспечивает полной стерильности объекта, так как споры ряда анаэробных клостридий могут выдерживать кипячение в течение 3 ч.

Стерилизация сухим жаром. Стеклопосуду (пипетки, пробирки, колбы, чашки Петри и др.) выдерживают в сухожаровом шкафу при температуре от 160 до 180 °С в течение 1,0–1,5 ч. При такой обработке погибают вегетативные клетки и споры микроорганизмов.

Перед стерилизацией посуду моют и высушивают. Пробирки и колбы закрывают ватно-марлевыми пробками. Пробирки заворачивают в бумагу по 10–20 штук. На колбы надевают бумажные колпачки, предохраняющие горлышко от пыли. В концы пипеток, которые берут в рот, вставляют ватные тампоны. Пипетки помещают в специальные стеклянные или металлические пеналы или заворачивают в бумагу. При работе пипетки вынимают из пенала только за верхний конец, в который вставлен тампон. Чашки Петри заворачивают в бу-

магу (каждую отдельно или по 2–3 шт.). Посуду, подготовленную для стерилизации, загружают в сушильный шкаф не слишком плотно, чтобы обеспечить равномерный ее нагрев. По окончании стерилизации шкаф отключают, но не открывают до тех пор, пока температура в нем не снизится до 100–70 °С, чтобы предохранить посуду от растрескивания. Для сохранения стерильности посуду разворачивают непосредственно перед работой.

Стерилизация насыщенным паром под давлением – один из наиболее распространенных и эффективных методов, основанный на том, что пар, образующийся при кипячении воды, скапливается в замкнутом пространстве и повышает давление. При увеличении давления повышается температура пара (табл. 2.1).

Таблица 2.1

Соотношение показаний манометра и температуры насыщенного пара

Показания манометра, МПа	Температура насыщенного пара, °С	Показания манометра, МПа	Температура насыщенного пара, °С
0,00	100	0,15	128
0,05	112	0,20	134
0,10	121	0,30	144

Стерилизацию проводят в специальных герметически закрывающихся двустенных аппаратах – автоклавах. Принцип работы автоклава основан на возрастании температуры кипения воды при повышении давления. Воду в автоклаве нагревают для образования пара при помощи электрической энергии. Основными частями автоклава являются: кожух, водопаровая камера, стерилизационная камера, крышка с резиновой прокладкой. Дополнительно к автоклаву прилагаются: манометр с сифонной трубкой и трехходовым краном, водомерная стеклянная трубка для контроля уровня воды в водопаровой камере, предохранительный клапан для предупреждения чрезмерного повышения давления в автоклаве, воздушный и спускной клапаны для удаления воздуха вначале стерилизации и для удаления конденсата из стерилизационной камеры.

В автоклавах стерилизуют питательные среды, физиологические растворы, резиновые предметы, стеклянную посуду с резиновыми пробками. Режим стерилизации (температура и продолжительность обработки) определяется составом питательной среды, значе-

нием рН. Среда, содержащая сахара, молоко, витамины, стерилизуют при давлении 0,05 МПа в течение 15–20 мин, мясопептонные среды – при давлении 0,10 МПа в течение 20–30 мин. Время стерилизации отсчитывают от момента установления необходимого давления.

При низком значении рН некоторые вещества, входящие в состав питательной среды, в процессе стерилизации подвергаются гидролизу. Во избежание этого растворы некоторых компонентов (аминокислоты, витамины) стерилизуют отдельно и добавляют в среду после стерилизации.

Стерилизация текущим паром (дробная стерилизация) – метод, применяемый для обеспложивания питательных сред, изменяющих свой состав при воздействии температур выше 100 °С. Сущность дробной стерилизации состоит в том, что нагревание среды проводят по 15–30 мин при температуре 100 °С в течение трех дней подряд. После первого прогревания погибают вегетативные клетки, некоторые споры при этом сохраняются и затем прорастают. Образовавшиеся из термоустойчивых спор вегетативные формы погибают при повторном нагревании. Дробную стерилизацию проводят в аппарате Коха или в автоклаве при открытом спускном кране.

Тиндализация – дробная стерилизация материалов, легко разрушающихся при высокой температуре (сыворотки, витамины, некоторые антибиотики). Стерилизацию проводят прогреванием объекта при температуре от 60 до 65 °С в течение 60 мин 5–6 дней подряд или при температуре 70–80 °С в течение 3 дней.

Холодная стерилизация

Фильтрование через бактериальные фильтры. Фильтрование через мелкопористые фильтры применяют в тех случаях, когда повышенная температура может резко изменить качество стерилизуемых материалов. Кроме того, стерилизация фильтрованием используется для очистки бактериальных токсинов и других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

Существуют два основных типа фильтров – глубинные и мембранные.

Глубинные фильтры состоят из волокнистых материалов. Частицы задерживаются в них в результате адсорбции и механического захвата в материале фильтра. Бактериальные фильтры изготавливаются из разного материала и с разным диаметром пор, что указывает-

ся на упаковке. Для стерилизации фильтрованием используют пластинчатые асбестовые фильтры Зейтца, свечи Шамберлана, изготовленные из каолина с примесью кварцевого песка, свечи Беркефельда из инфузорной земли и асбеста.

Мембранные фильтры имеют непрерывную структуру, они состоят из нитроклетчатки, и захват ими частиц определяется размером пор. Мембранные фильтры обозначают номерами от 1 до 5 в зависимости от диаметра пор (350–1200 нм).

Стерилизацию фильтрованием осуществляют под вакуумом с использованием вакуумного или водоструйного насоса. Перед началом работы фильтры закрепляют в специальном держателе, который соединяют с колбой Бунзена. Установку для фильтрования стерилизуют в автоклаве в течение 30–40 мин при 0,15 МПа. Мембранные и асбестовые фильтры используют однократно. Свечи Шамберлана и Беркефельда после окончания фильтрования промывают дистиллированной водой, просасывая ее в обратном направлении, и обрабатывают для повторного использования.

Стерилизация облучением. Стерилизация ультрафиолетовыми лучами применяется для уничтожения микроорганизмов в воздухе помещений, на поверхности пищевых продуктов перед их упаковкой. Ее проводят с помощью бактерицидных ламп различной мощности (длина волны 253–265 нм). Ионизирующее излучение применяют для стерилизации некоторых упаковочных материалов, используемых в пищевой промышленности.

Дезинфекция

Уничтожение микроорганизмов при помощи химических веществ называется *дезинфекцией* (от лат. *infektia* – инфекция и французской отрицательной приставки *des*). Химические вещества применяются для уничтожения патогенных микроорганизмов в объектах внешней среды – на рабочем месте, в помещениях, на рабочей одежде, руках, технологическом оборудовании и инвентаре.

К веществам, используемым с целью дезинфекции, предъявляется целый ряд требований:

- они должны хорошо растворяться в воде;
- в короткие сроки проявлять бактерицидное действие;
- не оказывать токсического действия на человека и животных;
- не вызывать порчу обеззараживаемых предметов.

Дезинфицирующие вещества подразделяют на несколько групп:

- 1) хлорсодержащие соединения (хлорная известь, натрия гипохлорит, хлорамин, пантоцид, хлордезинсульфохлорантин и др.);
- 2) соединения на основе йода и брома (йодопирин, дибромантин);
- 3) окислители (пероксид водорода, перманганат калия и др.);
- 4) фенолы и их производные (фенол, лизол, креолин, гексахлорофен);
- 5) соли тяжелых металлов (мертиолят натрия, сулема).

Антимикробным действием обладают также кислоты и их соли (борная, салициловая), щелочи, спирты (70 %-й раствор этанола), альдегиды (формальдегид).

Выпускаются также бактерицидные мыла: феноловое, дегтярное, «Гигиена», содержащие 3–5 % гексахлорофена.

Контрольные вопросы

1. Какие методы стерилизации Вы знаете?
2. Какие методы стерилизации относятся к термическим?
3. Как подготовить лабораторную посуду для стерилизации?
4. Какие факторы определяют режим стерилизации?
5. В каких случаях используют «холодные» методы стерилизации?
6. Какие требования предъявляют к дезинфицирующим веществам?
7. Какие вещества используют для дезинфекции?

3. МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы: получить представление о работе с чистыми культурами микроорганизмов; научиться готовить фиксированные окрашенные и прижизненные препараты микроорганизмов и препараты-отпечатки.

В практике микробиологии морфологию, биохимию и физиологию микроорганизмов изучают, используя чистые культуры микроорганизмов. Чистой культурой называют популяцию микроорганизмов, являющихся потомством одной клетки.

При работе с чистыми культурами следует соблюдать определенные условия, которые позволили бы предохранить их от загрязнения другими микроорганизмами. Все операции проводят в зоне горящей спиртовки. Мелкие предметы (предметные стекла, пинцеты, ножницы, бактериологические петли и иглы) стерилизуют – фламбируют (от нем. *flamme* – пламя) в пламени спиртовки. Микроорганизмы, выращенные на плотной среде, извлекают из пробирки с помощью бактериологической петли или иглы. Для взятия бульонной культуры используют стерильную пипетку или петлю.

3.1. Приготовление фиксированных окрашенных препаратов микроорганизмов

Цель фиксации: убить клетки микроорганизмов и зафиксировать их на поверхности предметного стекла, чтобы они не были смыты при окрашивании и промывке водой; улучшить окраску клеток, поскольку мертвые клетки становятся более проницаемыми для красителей.

Порядок приготовления фиксированного окрашенного препарата при взятии культуры микроорганизмов, выращенных в пробирке на скошенном питательном агаре, следующий:

1. Зажечь спиртовку.
2. Взять чистое предметное стекло и профламбировать его, пронеся несколько раз сквозь пламя спиртовки.
3. Охладить стекло на столе и нанести на него каплю воды из флакона.

4. Взять пробирку с культурой в левую руку между большим и указательным пальцами и держать в наклонном положении так, чтобы было видно содержимое пробирки.

5. Взять в правую руку бактериологическую петлю, накалив докрасна проволоку в пламени спиртовки и обжечь примыкающую к проволоке часть держателя.

6. Мизинцем и безымянным пальцем правой руки прижать к ладони ватную пробку, вынуть ее из пробирки и держать в таком положении, не касаясь окружающих предметов.

В н и м а н и е ! Класть пробку на стол или другие поверхности нельзя во избежание ее контаминации микроорганизмами (от лат. *contaminatio* – приведение в соприкосновение).

7. Край открытой пробирки обжечь в пламени спиртовки.

8. Ввести петлю в пробирку и, охладив ее о стенки пробирки, взять небольшое количество культуры с поверхности питательной среды.

В н и м а н и е ! Питательный агар нельзя нарушать петлей.

9. Снова обжечь края пробирки в пламени горелки и закрыть ее, пронося пробирку сквозь пламя и надевая ее на пробку. Пробирку с культурой поставить в штатив.

10. Извлеченный из пробирки петлей материал внести в каплю воды на предметном стекле и после аккуратного перемешивания тонким слоем равномерно распределить по поверхности стекла.

11. Оставшиеся на петле клетки микроорганизмов тщательно сжечь в пламени горелки, после чего петлю поставить на место.

12. Суспензию микроорганизмов высушить в потоке горячего воздуха над пламенем спиртовки и зафиксировать, пронося 3–4 раза над пламенем (нельзя фиксировать невысушенные мазки).

13. После охлаждения стекло положить на мостик и окрасить метиленовым синим в течение 2 мин, следя по песочным часам.

14. Краску смыть водой, препарат осушить фильтровальной бумагой, осторожно прикладывая ее к предметному стеклу.

15. На окрашенный препарат нанести каплю кедрового масла. Предметное стекло положить на предметный столик, при помощи макровинта погрузить иммерсионный объектив (90х) в масло и найти микроскопическую картину, используя для установления четкости изображения микровинт.

В н и м а н и е ! Нельзя использовать микровинт для поиска изображения микробов в препарате.

3.2. Приготовление прижизненных препаратов микроорганизмов

Прижизненные препараты используют для исследования микробов в живом виде с целью наблюдения их подвижности, прорастания спор, способа деления и т.д. Существуют два основных способа приготовления прижизненных препаратов микроорганизмов – «раздавленная капля» и «висячая капля».

Препарат «раздавленная капля». На чистое предметное стекло наносят из флакона каплю воды. В нее из пробирки вносят петлей небольшое количество исследуемой культуры и осторожно перемешивают, не размазывая по стеклу. Культуру, выращенную в жидкой среде (суспензию микроорганизмов), наносят на предметное стекло пипеткой.

Суспензию микроорганизмов накрывают сверху покровным стеклом так, чтобы под ним не было пузырьков воздуха, мешающих исследованию. Избыток выступившей жидкости удаляют фильтровальной бумагой, прикладывая ее к краям покровного стекла.

На покровное стекло наносят каплю кедрового масла и рассматривают препарат с иммерсионным объективом при опущенном конденсоре. Активно движущиеся бактерии проплывают через все поле зрения, меняют направления, совершают вращательные и круговые движения.

Препарат «висячая капля». Для приготовления такого препарата требуются специальное предметное стекло с лункой посередине и обычное покровное стекло. Края лунки предметного стекла смазывают вазелином. Небольшую каплю бульонной культуры микроорганизмов (суспензию) наносят на середину покровного стекла. Предметное стекло переворачивают лункой вниз и опускают ее на покровное стекло таким образом, чтобы находящаяся на нем капля суспензии приходилась на центр лунки.

Предметное стекло слегка прижимают к покровному, и стекла склеиваются. Препарат приподнимают и быстро переворачивают покровным стеклом кверху. Получается герметическая камера, в которой капля долго не высыхает. В правильно подготовленном препарате капля должна свободно свисать с покровного стекла и не соприкасаться с дном или краями лунки. На покровное стекло наносят каплю иммерсионного масла и рассматривают с объективом 90х в затемненном поле зрения (при суженной диафрагме и опущенном конденсоре).

3.3. Приготовление препарата-отпечатка

Препарат-отпечаток используют для изучения естественного расположения клеток микроорганизмов на поверхности субстрата или пищевого продукта. Чистое предметное стекло фламбируют и прикладывают к поверхности исследуемого продукта (мяса, рыбы, сыра и т. п.). Препарат-отпечаток фиксируют над пламенем спиртовки и окрашивают метиленовым синим или по Граму. На препарат наносят каплю кедрового масла и микроскопируют с иммерсионным объективом.

3.4. Красители и индикаторы pH, используемые в микробиологической практике

Без окрашивания микроорганизмы (кроме грибов) не видны в световой микроскоп из-за их малой контрастности. В микробиологической практике окрашивание широко используют для определения формы, размеров, структуры, взаимного расположения микробов. Способы окрашивания фиксированных препаратов разделяются на простые и сложные. Для простых способов окрашивания микроорганизмов применяют основные и кислые анилиновые красители. У основных красителей хромофором (ионом, придающим окраску) является катион, у кислых – анион. Основные красители более интенсивно связываются с ядерными компонентами клетки. Кислые красители хорошо окрашивают цитоплазматические компоненты клеток.

К *основным* красителям относятся:

- красные – нейтральный красный, фуксин основной, сафранин, тионин, пиронин, гематоксилин;
- синие – метиловый синий, «Виктория»;
- фиолетовые – кристаллический фиолетовый, генциан фиолетовый;
- зеленые – янус зеленый, малахитовый зеленый, метиловый зеленый;
- черные – индулин.

К *кислым* красителям относятся:

- красные и розовые – фуксин кислый, эозин, эритрозин;
- желтые – конго, пикриновая кислота, флуоресцин;
- черные – нигрозин.

При простых способах окрашивания нельзя установить структуру микробов, а также зачастую их дифференцированное отношение к красителям. Для достижения этих целей применяют сложные способы окрашивания. К сложным способам относятся метод Грама (см. раздел 7.2), выявление кислотоустойчивости по Циллю–Нельсену, определение зерен полифосфатов по Леффлеру (см. раздел 6.3), выявление спор бактерий по Циллю–Нельсену или по Пешкову (см. раздел 7.4), выявление капсул по Гинсу–Бурри (см. раздел 7.5) и др.

Индикаторы pH – органические вещества, которые реагируют на изменение активной кислотности среды изменением ее цвета. В процессе жизнедеятельности микроорганизмы изменяют кислотно-щелочное соотношение среды, в которой они развиваются, поэтому индикаторы используют для регистрации этих изменений. Индикаторы, окрашенные в одной среде и бесцветные в другой, называют *одноцветными*, а индикаторы, имеющие разную окраску по ту и другую стороны интервала, называют *двухцветными*.

В микробиологии наиболее часто употребляются двухцветные индикаторы, приведенные в табл. 3.1.

Таблица 3.1

Двухцветные индикаторы

Индикатор	pH, при котором изменяется окраска	Изменение цвета
Тимоловый синий (кислый)	1,2–2,8	Красный→желтый
Бромфеноловый синий	3,0–4,6	Желтый →синий
Бромкрезолгрюн	3,8–5,4	Желтый →синий
Метилловый красный	4,4–6,0	Красный→желтый
Бромкрезоловый пурпурный	5,2–6,8	Желтый →пурпурный
Бромтимоловый синий	6,0–7,6	Желтый →синий
Феноловый красный	6,8–8,4	Желтый →красный
Крезоловый красный	7,2–8,8	Желтый →красный
Тимоловый синий (щелочной)	8,0–9,6	Желтый →синий

Например, при идентификации микроорганизмов для установления их сахаролитических свойств используют так называемый «цветной ряд» Гисса. Среда Гисса готовят на 1 %-й пептонной воде с добавлением 0,5–1,0 %-го углевода и индикатора Андреде (с красным фуксином) или бромтимолового синего. Начальный цвет среды (а также при отсутствии ферментативной активности) – соломенно-желтый с индикатором Андреде или сине-зеленый с бромтимоловым

синим. Засеянные пробирки со средой Гисса инкубируют при оптимальной температуре в течение 24 ч. Микроорганизмы расщепляют углеводы с образованием кислоты, за счет чего изменяется цвет среды: розово-красной становится среда с индикатором Андреде, желтой – среда с бромтимоловым синим.

Контрольные вопросы

1. Какие условия необходимо соблюдать при взятии чистой культуры микроорганизмов для приготовления препарата?
2. Каковы цели фиксации препарата?
3. Каковы способы приготовления прижизненных препаратов микроорганизмов?
4. Какие простые и сложные способы окрашивания препаратов микроорганизмов Вы знаете?
5. Какие красители используют для окрашивания микроорганизмов?
6. Какие индикаторы pH используют в микробиологической практике?

4. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы: дать представление о разновидностях питательных сред, используемых для выращивания микроорганизмов; ознакомить студентов с методами посева и пересева микроорганизмов.

Выращивание микроорганизмов на питательных средах называют культивированием (от лат. *cultus* – выращивание), а развившиеся при этом микробы – культурой. Различают *чистую* культуру, являющуюся потомством клеток только одного вида; *накопительную* культуру, в которой преобладают клетки одного вида или группы родственных микроорганизмов, и *смешанную* культуру, представляющую собой консорциум нескольких видов микроорганизмов.

Внесение какого-либо исследуемого материала (пробы воды, продукта, образца почвы и т.д.) в стерильную питательную среду называется *посевом*. Перенесение уже выращенной культуры в стерильную среду называется *пересевом*, а при многократных пересевах – *пассированием* (от лат. *passis* – чередование).

При культивировании микроорганизмов важно создать оптимальные условия для их роста. Основными факторами, влияющими

на скорость роста, являются температура, рН среды, наличие или отсутствие кислорода, состав и свойства среды.

Микроорганизмы выращивают при оптимальной для каждого из них температуре в термостатах или термостатных комнатах. Этот процесс называется *инкубацией*, или *инкубированием* (от лат. *incubatio* – выращивание, высиживание птенцов). В частности, мезофильные микроорганизмы выращивают при температуре от 25 до 30 °С, термофильные – при температуре 40–45 °С, бактерии группы кишечной палочки – обычно при температуре 37 °С.

Микроорганизмы весьма требовательны к реакции среды. Поэтому до стерилизации необходимо установить требуемое значение рН среды с учетом снижения его на некоторую величину после стерилизации.

Культивирование микроорганизмов в лабораторных условиях осуществляют в стеклянной посуде: колбах, пробирках, чашках Петри, матрацах (плоских стеклянных бутылках), в жидкой среде (бульоне), в молоке или на плотных питательных средах.

Чистые культуры микроорганизмов обычно выращивают в пробирках на скошенном агаре или в бульонной среде. Если для выращивания в пробирках требуется плотная среда, то при подготовке к стерилизации расплавленную среду наливают на $\frac{1}{3}$ – $\frac{1}{4}$ объема пробирки. После стерилизации пробирки с незастывшей средой раскладывают в наклонном положении. Пробирки с застывшей средой называют *косяками*.

Для выращивания аэробных бактерий в жидкой среде пробирку заполняют питательным бульоном на $\frac{1}{3}$, а для анаэробных бактерий – на $\frac{2}{3}$. Характерными признаками роста микроорганизмов в бульоне являются равномерное помутнение, образование пленки на поверхности, наличие осадка определенного типа и др.

Пробирки, заполненные на $\frac{1}{2}$ объема застывшей плотной средой, называют *столбиками*. Их используют для посева культуры *уколом*.

Для выращивания микроорганизмов в колбах используют только жидкие питательные среды, а в чашках Петри – плотные.

В чашках Петри, как правило, культивируют аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы. Они образуют на поверхности плотной питательной среды колонии определенного типа.

Для культивирования анаэробных бактерий используют специальные приборы – анаэростаты (рис. 4.1).



Рис. 4.1. Анаэроостат

Анаэроостат представляет собой цилиндр, который через вакуумную резиновую прокладку закрывают крышкой. На крышке анаэроостата расположены вакуумметр и два крана: один присоединяется к насосу, откачивающему воздух, другой – к баллонам с газами (N_2 , CO_2 , H_2). После размещения чашек или пробирок из анаэроостата удаляют воздух при помощи вакуумного насоса, затем кран перекрывают специальным винтом, анаэроостат разъединяют с вакуумным насосом и переносят его в термостат.

4.1. Питательные среды

Для обнаружения и количественного учета микроорганизмов в пищевых продуктах, их выделения и изучения свойств используют разные по составу и назначению питательные среды. Любая питательная среда должна отвечать следующим требованиям: содержать все необходимые для питания микроорганизмов вещества в легко усвояемой форме, иметь оптимальные влажность, вязкость, pH, быть изотоничной и по возможности прозрачной. Каждую питательную среду стерилизуют определенным способом в зависимости от ее состава.

По составу различают синтетические и натуральные питательные среды.

Синтетические среды представляют собой водные растворы определенных химически чистых соединений в установленных дозировках, т. е. их состав полностью известен. Однако лишь для немногих нетребовательных к питанию микроорганизмов используют синтетические питательные среды.

Натуральные, или естественные, среды состоят из продуктов растительного или животного происхождения и имеют сложный неопределенный химический состав. К ним относятся мясопептонный бульон и агар, солодовое сусло и сусло-агар, обезжиренное и гидролизованное молоко, отвары различных овощей и т.д.

По целевому назначению питательные среды делят на основные, элективные и дифференциально-диагностические.

Основными являются среды, которые применяют для выращивания многих бактерий. К ним относятся мясопептонный бульон (МПБ), триптические гидролизаты мясных, рыбных продуктов, казеина. Такие среды служат основой для приготовления сложных питательных сред. К ним добавляют кровь, сахар, молоко и другие ингредиенты.

Элективные, или избирательные, среды были введены в микробиологическую практику С.Н. Виноградским и М. Бейеринком. Они предназначены для выделения и накопления микроорганизмов определенного вида (или определенной группы) из объектов, содержащих разнообразную микрофлору. Сопутствующие микроорганизмы или совсем не растут на таких средах или развитие их сильно подавлено. Разработка элективных сред основана на биологических особенностях, отличающих данные микроорганизмы от многих других.

Дифференциально-диагностические среды позволяют по возможности быстро установить и отличить (дифференцировать) одни виды или группы микроорганизмов от других. Их состав подбирается с таким расчетом, чтобы можно было четко выявить наиболее характерные свойства данного вида. Часто это достигается введением в среды специальных красителей-индикаторов, которые окрашивают колонии выявляемых микроорганизмов в определенный цвет. В частности, для выявления бактерий группы кишечной палочки используют дифференциально-диагностические среды Эндо, Кесслера, Эйкмана, Плоскирева, Левина и др.

По физическому состоянию среды разделяют на жидкие, полужидкие, плотные, сухие.

Жидкие среды (бульоны) используют для накопления биомассы микроорганизмов или продуктов их метаболизма, а также для выявления физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов.

Полужидкие среды содержат от 0,08 до 0,7 % агара.

Плотные среды готовят из жидких путем добавления к ним желирующих веществ – желатина или агара (1,5–2,0 %). Оба эти ве-

щества при растворении в горячей воде образуют коллоидный раствор, дающий при охлаждении плотный студень (гель). Студнеобразные среды можно вновь расплавлять нагреванием. Плотные среды используют для выделения чистых культур микроорганизмов, в диагностических целях (описание выросших на среде колоний), для количественного учета микроорганизмов, определения антагонистической, протеолитической активности и т.д.

Сухие питательные среды, выпускаемые специальными предприятиями, используют в микробиологических целях путем добавления в них воды с последующей стерилизацией.

4.2. Техника посевов микроорганизмов на питательные среды

Для работы с микроорганизмами используют специальные бактериологические петли, иглы, шпатели, пипетки. Посевы всегда проводят в зоне пламени горелки. Около работающего с чистой культурой нельзя делать резких движений, ходить, кашлять и т.п., так как движение воздуха увеличивает опасность попадания посторонних микроорганизмов в пробирку с культурой. Поэтому посевы и пересевы микроорганизмов рекомендуется проводить в боксе. Бокс представляет собой небольшое изолированное помещение, разделенное перегородкой на две части. В основное помещение бокса входят через тамбур, в котором должны висеть халаты, предназначенные только для работы в боксе. Все оборудование бокса, его стены и пол регулярно моют и протирают дезинфицирующими веществами. Перед работой бокс стерилизуют при помощи бактерицидных ламп в течение 1,0–1,5 ч.

Посев в жидкую питательную среду. Посев производят петлей или градуированной пипеткой. Посевной материал бактериологической петлей осторожно вносят в пробирку и легко встряхивают в верхнем слое питательной среды или растирают по стенке, смывая его жидкой средой.

Стерильную пипетку опускают в пробирку с культурой, отбирают определенное количество материала и переносят его в пробирку со свежей питательной средой, выпуская жидкость по стенке пробирки, или вносят пипетку вглубь среды и выпускают содержащийся в ней материал.

Посев штрихом в пробирку со скошенным агаром. Пробирку с культурой и пробирку со скошенным питательным агаром берут в левую руку и держат в наклонном положении. В правую руку берут бактериологическую иглу и прокаливают ее в пламени спиртовки до покраснения, затем проносят сквозь пламя иглодержатель. Мизинцем правой руки вынимают пробки из обеих пробирок, обжигают края пробирок. Петлю вводят в пробирку с культурой, охлаждают ее о края пробирки и осторожно снимают небольшое количество микробной культуры. Петлю с посевным материалом быстро переносят в пробирку со стерильной средой и опускают почти до дна, где скапливается небольшое количество конденсационной влаги. Слегка касаясь агара, проводят зигзагообразную линию, при этом петлю не отрывают от поверхности питательной среды. После посева петлю вынимают из пробирки и обжигают вместе с остатками посевного материала. Затем обжигают края пробирок и внутренние концы пробок, после чего пробирки закрывают. На наружной поверхности пробирки пишут дату посева и наименование культуры.

Посев уколом. Профламбированной бактериологической иглой берут исследуемую культуру. Пробирку со столбиком питательной среды берут в правую руку, переворачивают вверх дном, вынимают из нее пробку, прижимая мизинцем к ладони. Подняв пробирку на уровень глаз, в центре столбика прокалывают плотную среду иглой снизу вверх на всю глубину. Затем иглу извлекают, пробирку закрывают пробкой, подписывают и помещают в термостат для выращивания.

Посев на поверхность среды в чашку Петри. В чашки Петри заливают расплавленный агар, дают ему застыть и подсушивают в термостате. Посев проводят бактериологической петлей или шпателем Дригальского (стеклянная палочка, согнутая в виде треугольника). При использовании петли посев осуществляют штриховым методом. Крышку чашки Петри слегка приоткрывают настолько, чтобы в образующуюся щель проходила петля. Петлю кладут плашмя на питательную среду, чтобы не поцарапать ее, и наносят микробную культуру зигзагообразными движениями (штрихом) по всей поверхности агара, не отрывая от среды, что дает возможность получить изолированные колонии.

Посевы «газоном» производят шпателем. Для этого, приоткрыв левой рукой крышку чашки Петри, петлей или пипеткой нано-

сят посевной материал на поверхность питательного агара. Затем проводят шпатель сквозь пламя горелки, остужают его о внутреннюю сторону крышки и растирают материал по всей поверхности среды. После инкубации посевов в чашке появляется равномерный газон выросшей культуры.

Глубинный посев в чашку Петри. Определенное количество подготовленного к посеву исследуемого материала (1,0 или 0,1 см³) вносят пипеткой в пустую чашку Петри. Из пробирки или колбы с расплавленной и остуженной до 45 °С питательной средой вынимают пробку, обжигают края в пламени горелки и, слегка приоткрыв крышку, выливают на дно чашки.

Пробирки и чашки с посевами помещают в термостат с температурой, оптимальной для конкретного микроорганизма. Как правило, мезофильные бактерии выращивают при температуре 37±1 °С, термофильные бактерии – при 40–55 °С, дрожжи и плесени – при 30±1 °С.

Контрольные вопросы

1. Что такое чистая, накопительная и смешанная культура?
2. Как классифицируют питательные среды по составу компонентов и назначению?
3. Какие среды позволяют получить преимущественный рост одних микробов при одновременном подавлении роста других?
4. Какими методами производят посев микроорганизмов на питательные среды?
5. Как осуществляют культивирование аэробных и анаэробных бактерий?

5. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Цель работы: ознакомиться с морфологией наиболее распространенных мицелиальных грибов – возбудителей порчи пищевых продуктов.

Большинство плесневых грибов являются сапрофитами, но среди них встречаются и патогенные виды, вызывающие заболевания человека, животных, растений. Многие мицелиальные грибы вызывают порчу пищевых продуктов, размножаясь на их поверхности или внутри. Кроме того, некоторые грибы в процессе своей жизнедеятельности способны синтезировать ядовитые продукты метаболизма – микотоксины. Накопление микотоксинов в пищевых продуктах может вызывать пищевое отравление или оказывать гепатогенное, тератогенное или канцерогенное действие.

На плотных субстратах плесени образуют округлые, пушистые, паутинистые или бархатистые колонии разных цветов: черного, коричневого, зеленого, серо-голубого, желтоватого или белого цвета. Колонии плесеней состоят из большого количества ветвящихся нитей, называемых *гифами*, толщина которых колеблется от 1,0 до 15 мкм, длина может достигать 100 мм. Гифы ветвятся и переплетаются, образуя тело гриба – *мицелий*. Большая часть гифов развивается в воздухе, образуя воздушный мицелий; часть гифов врастает в субстрат, формируя субстратный мицелий. Цвет колоний плесневых грибов зависит от того, в какой цвет окрашены споры; гифы мицелия бесцветны.

5.1. Классификация грибов. Характеристика некоторых представителей

В настоящее время грибы относят к надцарству эукариот, царству *Mycota (Fungi)*, в которое входят два отдела – грибы слизевики *Mухомycota* и настоящие грибы – *Eumycota*. Отдел *Eumycota* подразделяют на семь классов исходя из их строения и стадий развития: анаморфной (бесполой) и телеоморфной (половой). Четыре класса относятся к низшим грибам: *Chytridiomycetes*, *Hyphochytridiomycetes*, *Oomycetes*, *Zygomycetes* и три – к высшим: *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Deuteromycetes*.

Низшие грибы обладают двумя особенностями, которые позволяют отличить их от остальных грибов. Во-первых, они имеют од-

ноклеточный мицелий, неразделенный поперечными перегородками и называемый *несептированным* (от греч. *septum* – перегородка). В связи с этим он является одноклеточным и многоядерным. Во-вторых, споры низших грибов (спорангиоспоры) всегда образуются эндогенно (от греч. *endon* – внутри) в особых клетках – *спорангиях*, находящихся на концах плодоносящих гиф, – спорангиеносцах.

Высшие имеют хорошо развитый многоклеточный (*септированный*) мицелий, гифы у них разделены перегородками. Они размножаются как вегетативным путем с помощью экзоспор – *конидий*, так и половым путем с образованием *аскоспор* или *базидиоспор*.

Низшие грибы

1. **Класс *Chytridiomycetes*** (хитридиомицеты), как правило, не образуют мицелия, а тело представляет собой голый протопласт (плазмодий), который покрывается оболочкой в процессе превращения в спорангий. Внутри спорангия образуются подвижные зооспоры. Многие хитридиомицеты паразитируют на растениях. В пораженных клетках растений они образуют покоящиеся клетки – *цисты*, имеющие утолщенную оболочку.

Важнейшим представителем хитридиомицетов является возбудитель рака картофеля – *Synchytrium endobioticum*. На инфицированных клубнях около глазков образуются бугристые наросты – «опухоли». В наростах находится масса цист гриба. После разрушения наростов цисты попадают в почву и перезимовывают в ней. Весной цисты прорастают и превращаются в подвижные зооспоры, которые заражают молодые растения.

2. **Класс *Hyphochytridiomycetes*** (гифохитридиомицеты) – одноклеточные грибы, у которых отсутствует половая стадия размножения. Большинство видов этого класса являются внутриклеточными паразитами зеленых и бурых водорослей, культурных растений. В частности, вид *Plasmodiophora rassaica* является возбудителем килы крестоцветных культур, а *Spongospora subterranea* – возбудителем порошистой парши картофеля.

3. **Класс *Oomycetes*** (оомицеты) включает водные и наземные формы, размножающиеся как бесполым путем при помощи зооспор, так и половым путем с образованием ооспор. Грибы этого класса имеют хорошо развитый мицелий. К оомицетам относится возбудитель фитофтороза – *Phytophthora infestans*, поражающий картофель,

помидоры, баклажаны. На коротких разветвленных спорангиеносцах развиваются лимонovidные спорангии, которые после созревания опадают в почву. В них образуются зооспоры, прорастающие в гифы.

4. Класс *Zygomycetes* (зигомицеты) – наземные грибы, широко распространенные в природе. К ним относятся грибы родов *Mucor*, *Rizopus*, *Thamnidium*.

Род *Mucor*. Мукоровые грибы имеют пушистый паутинистый мицелий, сначала белый, затем серый. От основного мицелия поднимаются многочисленные плодоносящие гифы – *спорангиеносцы*, которые на концах вздуваются, образуя крупные спорангии. Снаружи спорангий покрыт тонкими шипами из кристаллов оксалата кальция. В спорангиях бесполым путем образуются многочисленные *спорангиоспоры*. Мукоровые грибы хорошо размножаются на поверхности влажного зерна, солода, корнеплодов, пищевых продуктов.

Mucor mucedo (рис. 5.1) образует колонии желтовато-сероватого цвета с неветвящимися спорангиеносцами, достигающими в длину до 4 см. Спорангии серые, иногда коричнево-черные.

Род *Rhizopus*. Грибы рода ризопус образуют войлокообразный мицелий серо-коричневого цвета. Отличается от мукоровых грибов дугообразно согнутыми побегами, называемыми *столонами*. К субстрату столоны прикрепляются тонкими отростками гифов – *ризоидами*, над которыми располагаются пучки (кустики) спорангиеносцев по 3–5 штук (иногда до 10). Спорангии шаровидные, сначала бесцветные, после созревания – черные. Грибы вида *Rizopus nigricans* (рис. 5.2) поражают ягоды, корнеплоды, вызывая их порчу – «мягкую гниль».

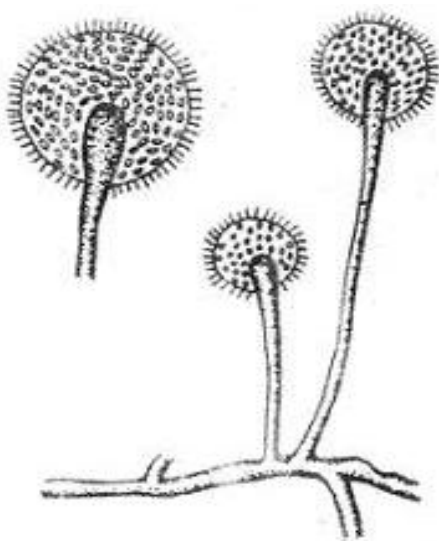


Рис. 5.1. *Mucor mucedo*

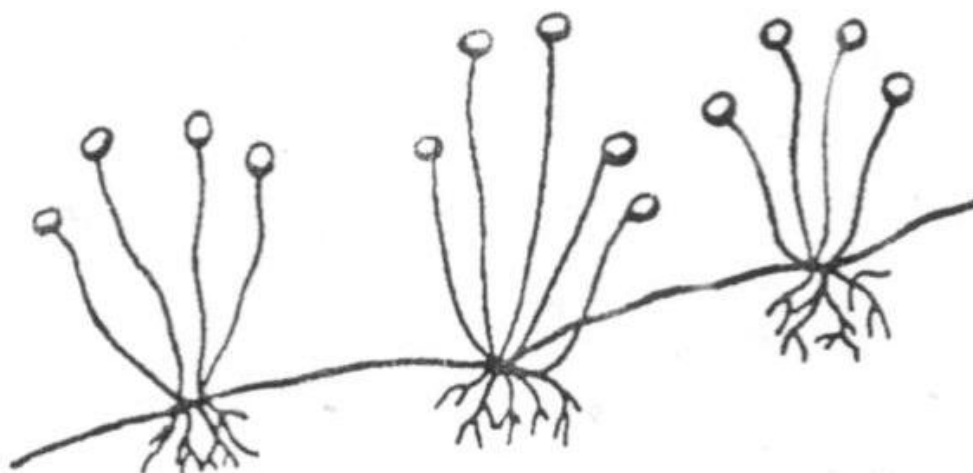


Рис. 5.2. *Rizopus nigricans*

Род *Thamnidium*. Грибы рода тамнидиум имеют мицелий серовато-белого цвета с длинными прямостоящими спорангиеносцами, на конце которых располагается крупный спорангий. На спорангиеносцах вырастают боковые ответвления, на которых образуются мелкие *спорангиоли* с небольшим количеством спорангиоспор.

Thamnidium elegans (рис. 5.3) хорошо растет при низких температурах, вызывая порчу мяса и мясопродуктов при холодильном хранении.

Высшие грибы

5. Класс *Ascomycetes* (аскомицеты – от греч. *ask* – сумка). Грибы этого класса имеют хорошо развитый многоклеточный мицелий. При половом процессе аскомицеты образуют аск с аскоспорами. Многие аскомицеты могут размножаться и бесполым способом с помощью экзоспор – конидий. Такую форму спороношения называют несовершенной. Наиболее распространенными представителями аскомицетов являются грибы родов *Penicillium* и *Aspergillus*.

Род *Penicillium*. Эта группа многоклеточных грибов наиболее широко распространена в природе вследствие большой устойчивости к условиям окружающей среды. Грибы рода пенициллиум образуют на поверхности субстрата низкие бархатистые колонии серого, голубоватого или зеленого цвета с более светлыми краями. Конидиеносцы у пенициллов многоклеточные, ветвящиеся. На концах разветвлений находятся вытянутые клетки – *стеригмы* с цепочками конидий, при этом кончики плодоносящих гифов напоминают кисточку (от лат. *penicillium* – кисть). Конидии гладкие или с шипами, округлые, окрашенные в разные цвета.

Penicillium glaucum – зеленый пеницилл (рис. 5.4) имеет серовато-зеленые колонии с прямыми кистевидно разветвленными конидиеносцами. Цепочки конидий большей частью плотно прижаты одна к другой. Этот вид часто размножается на поверхности хлеба, сливочного масла, сыров, кондитерских и макаронных изделий, на мясных тушах при холодильном хранении и других пищевых продуктах.

Грибы видов *Penicillium roqueforti* и *Penicillium camamberti* используют в производстве плесневых сыров: рокфора, бри, камамбера, дор-блю и др. Они придают этим сырам характерный специфический вкус и грибной запах.

Виды *P. chrysogenum* и *P. notatum* известны как продуценты антибиотика пенициллина.

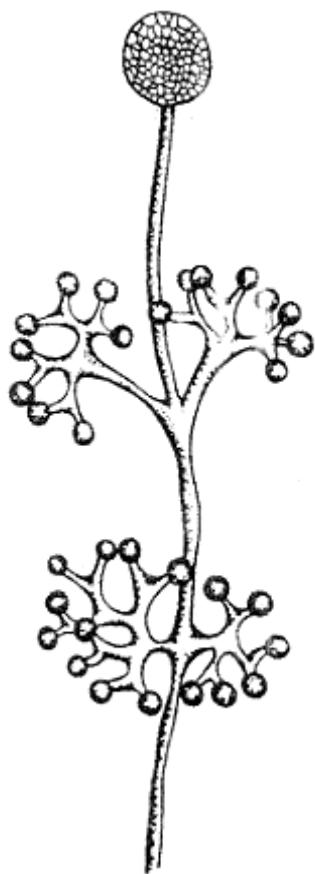


Рис. 5.3. *Thamnidium elegans*

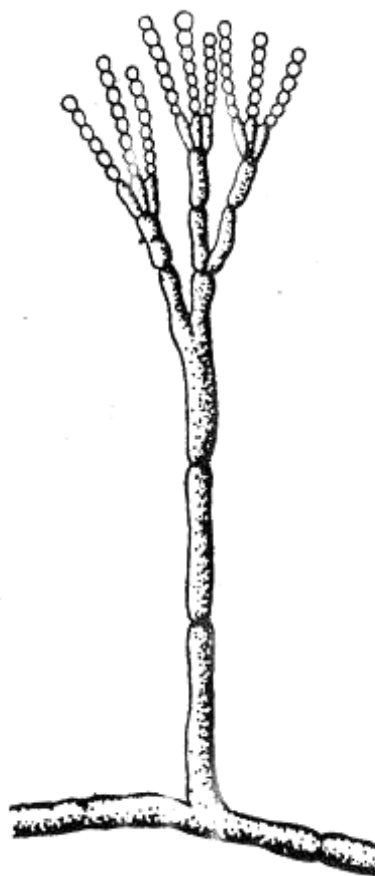


Рис. 5.4. *Penicillium glaucum*

Род *Aspergillus*. Конидиеносцы у аспергиллов несептированы, их утолщенные верхушки заканчиваются стеригмами, от которых отшнуровываются цепочки конидий. Конидии аспергиллов при со-

зревании приобретают различную окраску, что иногда выражается в видовом названии гриба и определяет наряду с другими признаками их видовую принадлежность.

Aspergillus niger (черный аспергилл – рис. 5.5) в начальной стадии образует белоснежный мицелий, на котором при созревании появляются конидиеносцы с коричнево-черными головками, поэтому колония гриба приобретает черную окраску.

Aspergillus glaucum (зеленый аспергилл) образует бархатистые колонии желтовато-зеленого цвета с короткими конидиеносцами.

Среди черных (*A. niger*, *A. awamori*), коричневых (*A. terreus*), желто-зеленых (*A. oryzae*, *A. flavus*) аспергиллов выделены активные продуценты различных ферментов, органических кислот, антибиотиков. Некоторые аспергиллы вызывают заболевания дыхательных путей, кожи, слизистой полости рта. *A. flavus* образует ядовитые вещества – афлатоксины.

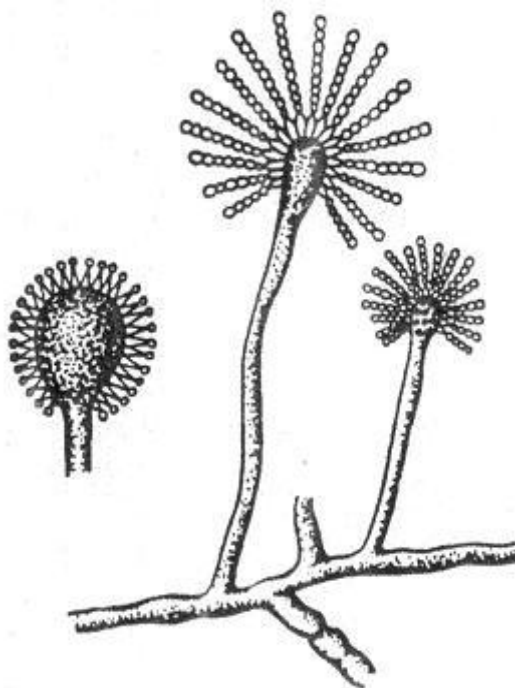


Рис. 5.5. *Aspergillus niger*

Род *Claviceps*. Главным представителем этого рода является *Claviceps purpurea* – фитопатогенный гриб, возбудитель спорыньи – заболевания, поражающего, в основном, рожь, реже пшеницу и ячмень в период цветения (рис. 5.6). В соцветиях пораженных спорыньей рас-

тений хорошо заметны *склероции*, имеющие вид рожков темно-фиолетового цвета. При уборке урожая склероции осыпаются, попадают в почву и там перезимовывают. Весной склероции набухают и прорастают, образуя плодовые тела в виде головок на нитевидных ножках. Из каждого склероция развивается несколько стром, имеющих красноватую окраску. Внутри головки стромы имеются полости, в которых происходит половой процесс, включающий формирование аскогона, антеридия, а также плазмогамии и кариогамии. Процесс завершается образованием сумок (асков), содержащих по восемь нитевидных аскоспор. Созревшие аскоспоры выбрасываются на цветы злаков в период их массового цветения и там прорастают в спороносный мицелий. Через несколько дней после заражения развивается конидиальная стадия гриба. Большую роль в распространении конидий гриба насекомыми играет «медвяная роса», в которую погружены конидии. В пораженной завязи к моменту созревания ржи мицелий уплотняется и вместо зерен формируются рожки (склероции). При повышенной влажности склероции образуются уже через неделю после появления «медвяной росы»; в сухую погоду – через две недели.



Рис. 5.6. Колос, пораженный спорыньей, и проросший склероций

Заболевание спорыньей снижает урожай зерна. Кроме того, попадание склероций в зерно может вызвать сильные отравления че-

ловека и животных (токсикозы). Описано большое количество токсинов спорыньи и их производных, обладающих высокой биологической активностью. Токсины представлены, главным образом, алкалоидами, являющимися производными эрготиновой и лизергиновой кислот. Употребление в пищу хлеба из муки, содержащей рожки спорыньи, вызывает слабость, головокружение, судороги (отравление, называемое «эрготизмом»). Примесь рожков спорыньи в зерне не должна превышать 0,05 %.

6. Класс *Basidiomycetes* (базидиомицеты). Это обширная группа высокоразвитых многоклеточных грибов, насчитывающая более 30 тыс. видов. Особенностью грибов этого класса является наличие специального органа – базидии, на которой в результате полового процесса развиваются базидиоспоры. К базидиомицетам относятся:

- шляпочные грибы (трубчатые, пластинчатые, игольчатые), которые имеют однолетнее плодовое тело в виде шляпки, прикрепленной к ножке;
- трутовые грибы, растущие на стволах деревьев и разрушающие древесину;
- домовые грибы, размножающиеся на деревянных частях зданий. При развитии этих грибов древесина постепенно разрушается, сгнивает;
- паразитические грибы, поражающие полевые, огородные и садовые растения. Их важнейшими представителями являются головневые (порядок *Ustilaginales*) и ржавчинные (порядок *Uredinales*) грибы.

Головневые грибы поражают преимущественно зерновые культуры, вызывая заболевание, называемое головней.

Различают твердую, пыльную и пузырчатую головню. В настоящее время широко распространена твердая (мокрая) головня пшеницы, ячменя, ржи, возбудителями которой являются виды *Tilletia caries*, *Tilletia hordei*. Головневые споры прорастают на наклюнувшемся семени еще до образования всходов. Мицелий проникает в проросток зерна и растет вместе с растением. К моменту цветения мицелий гриба проникает в завязь, и в фазе молочной зрелости внутренняя часть зерна заполняется головневыми спорами, или телеоспорами. В колосе вместо зерновки образуются округлые мешочки, наполненные массой черных хламидоспор. Пораженный ко-

лос имеет темноватый оттенок и напоминает обугленную лучину – отсюда произошло название «головня» (рис. 5.7).

Во время уборки урожая и при обмолоте мешочки разрушаются и споры попадают на поверхность здорового зерна. Зерно приобретает запах селедочного рассола вследствие присутствия в спорах триметиламина. Споры твердой головни гигроскопичны, при отсыревании легко мажутся. Мука из зерна, пораженного твердой головней, приобретает темный оттенок, неприятный запах и вкус, может вызвать раздражение слюнных желез и расстройство функций кишечника.



Рис. 5.7. Пыльная головня зерновых культур

7. Класс *Deuteromycetes* (дейтеромицеты – несовершенные грибы). К этому классу относятся многоклеточные грибы, которые размножаются бесполом путем с помощью *экзоспор* – конидий или *артроспор* (оидий); половой процесс у них отсутствует или он не обнаружен. Иногда отсутствует и конидиальное спороношение, образуются только склероции.

Дейтеромицеты широко распространены в природе; многие из них размножаются на культурных растениях и пищевых продуктах, вызывая их порчу.

Род *Cladosporium* – гроздевидная плесень, на поверхности субстрата образует бархатистые колонии оливково-зеленого цвета. Мицелий многоклеточный, слабоветвистый. Кладоспориум образует бластоспоры, развивающиеся на концах конидиогенной клетки в виде вздутый и затем отделяющиеся от нее перегородкой. Обратная сторона колоний, прилегающая к субстрату, имеет черную окраску. *Cladosporium herbarum* размножается при холодильном хранении на поверхности мяса, сливочного масла, сыра (рис. 5.8).

Род *Endomyces* образует белый бархатистый мицелий, гифы которого распадаются на отдельные клетки – *оидии*, называемые также *артроспорами* (рис. 5.9). Представителем рода является молочная плесень *Endomyces lactis* (синоним *Geotrichum candidum*), которая часто развивается на поверхности кисломолочных продуктов, сыров, сливочного масла. Мицелий молочной плесени никогда не темнеет и не образует цветного плодоношения. Молочная плесень обладает активными протеазами и липазами, поэтому ее размножение в молочных продуктах вызывает их прогоркание и появление неприятного специфического запаха.

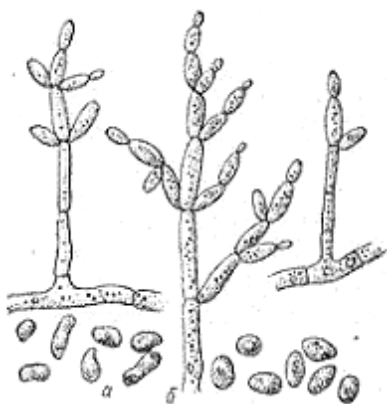


Рис. 5.8. *Cladosporium herbarum*
а – конидии; б – конидиеносцы



Рис. 5.9. *Endomyces lactis*
(синоним *Geotrichum candidum*)

Род *Fusarium* образует белые или окрашенные в ярко-розовый цвет колонии. Фузариум имеет два типа конидий: макроконидии – серповидные, которые развиваются на коротких конидиеносцах, и микроконидии – более мелкие, овальные, бесцветные (рис. 5.10). Макроконидии имеют характерную серповидную форму с одной или несколькими поперечными перегородками. Микроконидии – мелкие, овальные, бесцветные, одноклеточные или с одной-двумя перегород-

ками. Среди грибов этого рода много паразитических видов, вызывающих заболевания плодов и овощей – «фузариозы». Наиболее распространенным является вид *Fusarium avenaceum*. Некоторые виды накапливают микотоксины.

Род *Botrytis*. Ботритис развивается на субстрате в виде стелющегося серого или коричневатого налета. Иногда образует склеротии (скопления мицелия из плотно переплетающихся гифов), богатые запасными веществами и служащие для сохранения гриба в неблагоприятных условиях. Они окрашены в коричневый или черный цвет и видны невооруженным глазом. *Botrytis* имеет древовидно разветвленные конидиеносцы, на концах которых образуются короткие, густо сидящие стеригмы с гроздьями конидий (рис. 5.11). Конидии – эллипсовидные, иногда шаровидные, бесцветные. *Botrytis cinerea* (от греч. botrytis – гроздь, cinerea – серый) вызывает заболевания яблок, груш, ягод. Поверхность пораженных плодов покрывается пушистым серым налетом, растительная ткань буреет, размягчается под действием активных пектиназ гриба.

Род *Trichothecium* имеет стелющийся мицелий, на поверхности субстрата образует мучнистый налет, состоящий из конидиеносцев и конидий. Конидиеносцы прямые, с редкими перегородками. Конидии продолговатые, образуются по одной на верхушке конидиеносца или составляют головку, которая быстро распадается (рис. 5.12). *Trichothecium roseum* образует пушистые колонии абрикосово-розового цвета.



Рис. 5.10. *Fusarium avenaceum*
а – макроконидии; б – мицелий

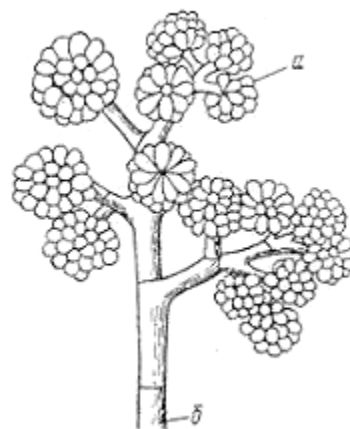


Рис. 5.11. *Botrytis cinerea*
а – конидии; б – конидиеносец

Род *Alternaria* (рис. 5.13) образует низкие паутинистые колонии сначала оливково-зеленого, а затем коричнево-черного цвета. От мицелия отходят короткие конидиеносцы, на которых находятся многоклеточные конидии грушевидной или заостренной формы. Гриб выделяет пигмент, который окрашивает субстрат под колонией в черный цвет. Грибы данного рода размножаются на сливочном масле и сыре, образуя темные пятна на их поверхности. Разные виды этого рода вызывают у растений заболевание – альтернариоз (черная гниль).

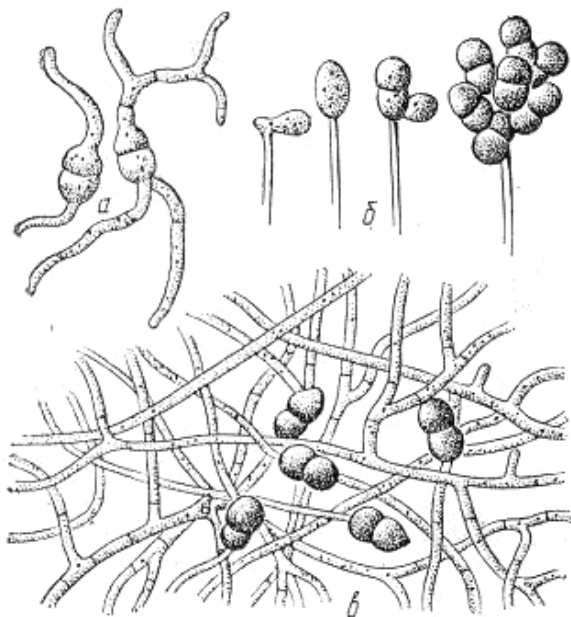


Рис. 5.12. *Trichothecium roseum*
а – развитие конидий; б – конидиеносцы;
в – мицелий с конидиями

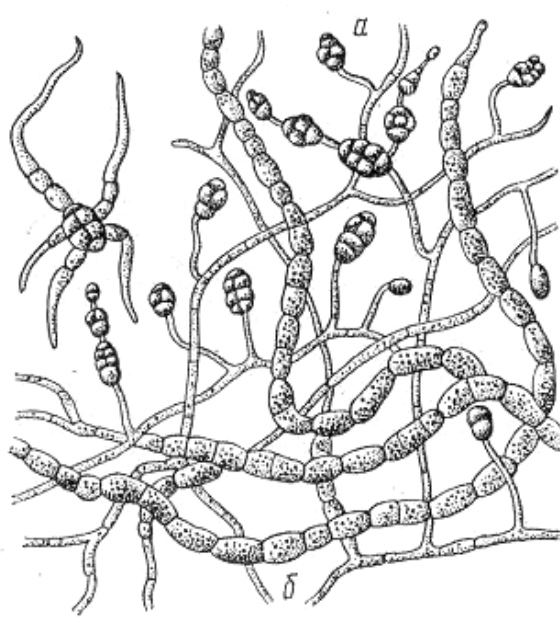


Рис. 5.13. *Alternaria radicina*
а – конидии; б – мицелий

Род *Trichoderma* (рис. 5.14). Плесень растет в виде рыхлых колоний с клочковатой поверхностью. Мицелий ползучий, бесцветный, с возрастом становится темно-зеленым. Конидиеносцы ветвящиеся, приподнятые над мицелием. На их концах развиваются заостренные стеригмы, на которых находятся головки конидий, по 20 штук в каждой. Споры между собой склеены слизью. *Trichoderma lignorum* имеет колонии изумрудно-зеленого цвета. Конидиеносцы вырастают на мицелии как боковые ветви.

Род *Phoma* (рис. 5.15) образует на поверхности субстрата сначала белый паутинистый мицелий, который затем темнеет и на нем появляются черные пятна пикнидий. Шаровидные пикниды погружены в субстрат, имеют небольшое круглое отверстие. Оболочка пик-

нид темно-коричневая, почти черная. Конидиеносцы неразветвленные, конидии овальные или яйцевидные. *Phoma* вызывает заболевание корнеплодов – *фомоз*. Например, *Phoma betae* вызывает сердцевинную гниль свеклы, *Phoma rostrupii* – фомозную гниль моркови. Иногда *Phoma* встречается в толще монолита сливочного масла в виде темных пятен.

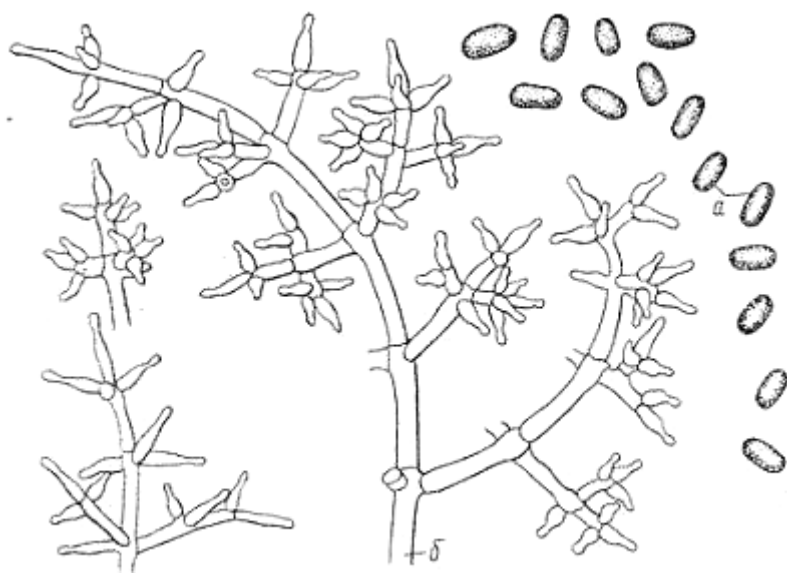


Рис. 5.14. *Trichoderma lignorum*
а – конидии; б – конидиеносец

Род *Catenularia* (рис. 5.16) образует мелкие, медленно растущие колонии шоколадно-коричневого цвета. Конидии блестящие, желто-коричневые, отходящие от концевых гифов воздушного мицелия в виде длинных цепочек. *Catenularia fuliginea* часто размножается в сгущенном молоке с сахаром, образуя комки или «пуговицы» шоколадного цвета.

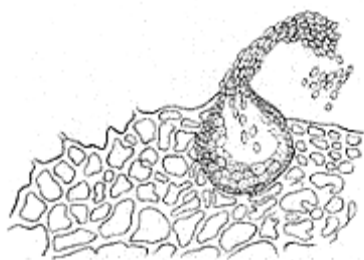


Рис. 5.15. *Phoma betae*



Рис. 5.16. *Catenularia fuliginea*

Род *Monilia*. Это переходная форма от дрожжей к мицелиальным грибам. Вначале колонии сходны с колониями дрожжей, лишь позднее клетки удлиняются и образуют настоящий мицелий, от которого поднимаются воздушные нити. Мицелий эндогенный, выступает на поверхность в виде плотных пучков. Конидии формируются в цепочки, а затем распадаются на отдельные клетки. Многие виды рода *Monilia* могут поражать семечковые и косточковые культуры. *Monilia fructigena* вызывает плодовую гниль яблок, груш, айвы и др. *Monilia cinerea* развивается на вишне, сливе, вызывая серую гниль.

Monilia nigra образует на корке твердых сыров черные пятна, проникающие внутрь сыра. *Monilia roseum* способна размножаться на поверхности сливочного масла, образуя розовые пятна.

Контрольные вопросы

1. По каким признакам отличают низшие грибы от высших?
2. Перечислите классы высших и низших грибов.
3. Назовите представителей низших грибов.
4. Назовите представителей грибов класса аскомицетов.
5. Назовите представителей грибов класса базидиомицетов.
6. Назовите представителей грибов класса дейтеромицетов.
7. Какую роль играют плесневые грибы в пищевой промышленности?

6. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ ДРОЖЖЕЙ

Цель работы: ознакомление с морфологией культурных дрожжей, используемых в пивоварении и хлебопечении, и диких дрожжей, вызывающих порчу пищевых продуктов.

Дрожжи относятся к эукариотам и являются одноклеточными микроскопическими грибами. На основании характера полового процесса или его отсутствия дрожжи относят к трем классам высших грибов – аскомицетам, базидиомицетам и дейтеромицетам.

Класс аскомицетов (*Ascomycetes*) включает три семейства дрожжей: *Saccharomycetaceae*, *Schizosaccharomycetaceae* и *Saccharomycodaceae*. Характерными признаками грибов этого класса являются половое спороношение и наличие в асках (сумках) двух, четырех или восьми аскоспор.

В пищевой и микробиологической промышленности широко используются дрожжи рода *Saccharomyces* из семейства *Saccharomycetaceae*. Сахаромицеты применяются при производстве спирта, вина, пива, кваса, хлеба, хлебопекарных дрожжей. В пивоварении используют различные штаммы дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae*, в хлебопечении – дрожжи видов *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida milleri* (ранее *Saccharomyces minor*).

Некоторые представители семейства *Saccharomycodaceae* (родов *Nadsonia*, *Saenko*) участвуют в брожении при производстве хересных и шампанских вин. Все остальные виды дрожжей являются посторонними («дикиими»), контаминирующими биотехнологический процесс на разных его стадиях.

Несовершенные дрожжи класса дейтеромицетов (*Deuteromycetes*) – это либо анаморфы известных аскомицетовых или базидомицетовых грибов, либо виды, для которых половая стадия не установлена или она отсутствует. В этом классе выделяют семейство *Candidaceae* с признаками аскомицетового аффинитета и два семейства – *Cryptococcaceae* (не образуют баллистоспор) и *Sporobolomycetaceae* (образуют баллистоспоры) – с признаками базидиомицетового аффинитета. Дрожжи родов *Candida* и *Trichosporon* способны образовывать псевдомицелий.

6.1. Характеристика некоторых видов культурных и диких дрожжей

Дрожжи представляют собой одноклеточные эукариотные микроорганизмы, размножающиеся почкованием, спорообразованием или бинарным делением. Размеры клеток дрожжей, используемых в пищевой промышленности, колеблются от 3 до 6 мкм в поперечнике и от 8 до 12 мкм в длину.

Для изучения морфологии дрожжей их выращивают в стерильном солодовом сусле с концентрацией сухих веществ от 8 до 10 % или в глюкозопептонной среде при температуре 25–28 °С в течение 2–3 сут.

Форма вегетативных клеток разных видов дрожжей весьма разнообразна. Форма и размеры дрожжевых клеток зависят от вида, возраста, питательной среды, способа культивирования. Клетки дрожжей могут иметь округлую, овальную, яйцевидную, реже цилиндрическую, лимоновидную (апикулятную) форму. У несовершенных дрожжей клетки имеют более характерную форму: стреловидную (род *Brettanomyces*), треугольную (род *Trigonopsis*), серповидную (род *Selenotila*), колбовидную (род *Schizoblastosporion*). У дрожжей родов *Candida* и *Trichosporon* наряду с округлыми и овальными клетками в препарате встречаются длинные клетки псевдомицелия.

Культурные дрожжи

Вид *Saccharomyces cerevisiae* (рис. 6.1).

Морфологические признаки. Клетки дрожжей данного вида имеют овальную, округлую, яйцевидную или слегка удлинённую форму размером (5–6)×(9–14) мкм. Цитологические особенности дрожжевой клетки могут существенно изменяться в зависимости от ее возраста. Новая молодая клетка развивается либо из споры при ее прорастании, либо образуется вегетативно при почковании.

М о л о д ы е активные клетки дрожжей (12–18-часовая культура) при микроскопировании имеют тонкую прозрачную оболочку и гомогенную, без видимых включений, цитоплазму, небольшую вакуоль. Иногда в цитоплазме встречаются одно–два зернышка полифосфатов. Молодые дрожжи интенсивно размножаются, при этом доля почкующихся клеток может достигать 70–80 %.

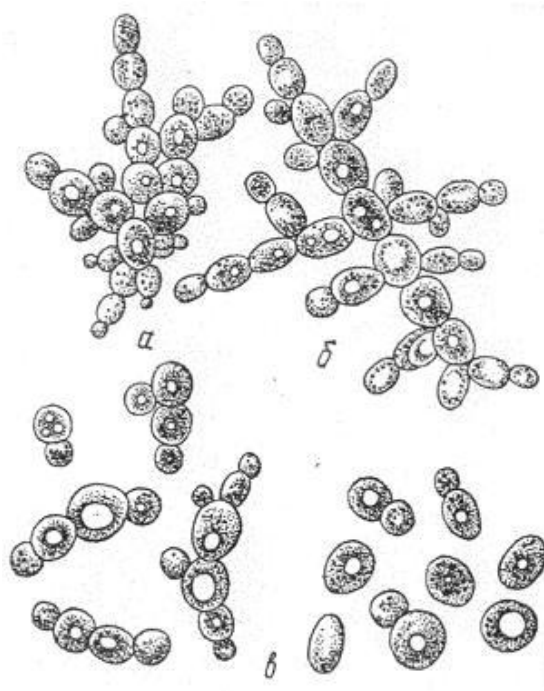


Рис. 6.1. Дрожжи вида *Saccharomyces cerevisiae*:
а – молодые клетки; б – зрелые; в – старые

Зрелые дрожжи (24–48-часовая культура) имеют зернистую неоднородную или гетерогенную цитоплазму. Количество клеток с вакуолями увеличивается, иногда обнаруживаются клетки с двумя и более вакуолями. Процесс размножения дрожжей замедляется; процент почкующихся клеток составляет в среднем 10–15 %. Внутри клетки появляются жировые включения, которые хорошо видны без специального окрашивания при полужакрытой диафрагме. В зрелых дрожжах встречается до 2–4 % мертвых клеток, которые выявляются с помощью прижизненного окрашивания суспензии дрожжей слабым раствором метиленового голубого. Метиленовый голубой проникает в цитоплазму только через оболочку мертвых клеток, в результате чего они окрашиваются в голубой цвет, тогда как живые клетки остаются бесцветными. Доля запасных веществ – липидов, гликогена – возрастает по мере роста клетки. Для зрелой культуры дрожжей характерно наличие в клетках большого количества гликогена. Он откладывается в вакуолях как резервное вещество и расходуется по мере старения клетки. При культивировании дрожжей на богатых углеводами средах без аэрации количество клеток с гликогеном составляет 65–70 %, что свидетельствует об «упитанности» и зрелости дрожжей. Гликоген выявляют путем окра-

шивания прижизненных препаратов дрожжей раствором йода. Наряду с гликогеном в зрелых дрожжах накапливается еще одно резервное вещество – метакроматин (волютин), который окрашивается в красно-фиолетовый цвет при окрашивании фиксированного препарата дрожжей метиленовым голубым.

Старые дрожжи (48 ч и более) имеют утолщенную оболочку, которая хорошо видна при микроскопировании. Цитоплазма зернистая, гетерогенная, вакуоли крупные, по несколько в одной клетке. В популяции старой культуры присутствует большое количество клеток, содержащих липиды в виде круглых, резко преломляющих свет включений. Характерным признаком старой культуры является наличие значительного количества мертвых клеток.

Существенные цитологические изменения происходят при изменении условий культивирования: переходе от аэробного процесса к анаэробному, замене состава среды и концентрации лимитирующих веществ, а также при стрессовых физиологических воздействиях.

В аэробных условиях дрожжи интенсивно размножаются, клетки более мелкие и однородные, митохондрии в них активно делятся, число их заметно возрастает.

В условиях анаэробного брожения митохондрии объединяются, в клетках накапливается больше гликогена, и он выглядит в виде крупных гранул.

Культуральные признаки. Колонии на сусло-агаре белые, круглой формы, с ровными краями и выпуклым центром, с гладкой тускло-блестящей поверхностью, диаметром 0,5–1,0 см. При росте на жидком солодовом сусле дрожжи этого вида образуют небольшой осадок желтовато-белого цвета.

Вид *Candida milleri* (ранее *Saccharomyces minor*). Дрожжи этого вида являются специфическими для ржаного теста.

Морфологические признаки. Клетки мелкие, круглые, диаметром 1,5–3,0 мкм с характерным почкованием: почки располагаются на одном из концов клетки. При выращивании дрожжей в жидкой среде почки образуются на обоих концах клеток или по две почки на одном конце.

Культуральные признаки. На сусло-агаре вырастают мелкие серовато-белые колонии с ровными краями и приподнятым центром, диаметром от 0,4 до 0,8 см. Поверхность колоний гладкая, блестящая. В солодовом сусле образуют небольшой осадок серовато-белого цвета, который при взбалтывании легко взмучивается.

Дрожжи, вызывающие порчу пищевых продуктов

Наряду с культурными дрожжами в биотехнологических процессах могут встречаться так называемые «дикие» дрожжи, которые конкурируют с культурными за питательные вещества субстрата и вызывают порчу или ухудшение органолептических показателей готового продукта. Чаще всего среди «диких» встречаются дрожжи родов *Saccharomyces*, *Kloeccera*, *Candida*, *Torulopsis*, *Pichia*, *Hansenula*, *Brettanomyces*, *Rhodotorula* и некоторые другие.

Вид *Saccharomyces pastorianus* (рис. 6.2, а) – клетки эллипсо-видные или колбасовидные, реже овальной формы. Не оседают с культурными дрожжами при главном брожении пива, при их размножении пиво мутнеет, плохо осветляется, приобретает неприятный запах, терпко-горький привкус.

Вид *Saccharomyces turbidans* (рис. 6.2, б) – клетки овальной или эллипсоидной формы, часто соединяются в цепочки по 4–5 клеток. В пиве вызывают сильную муть, порчу вкуса.

Вид *Kloeccera apiculata* (рис. 6.2, в) – клетки мелкие, лимон-овидные, заостренные на одном или двух полюсах, располагаются одиночно, реже парами. При старении приобретают вытянутую веретенообразную форму. Размеры клеток (5–8)×(2–4) мкм. При развитии в пиве накапливают летучие кислоты, эфиры и сероводород, придавая продукту неприятный специфический запах.

Вид *Saccharomyces bayanus* (рис. 6.2, г) – клетки крупные, овальные. Обнаруживаются в пиве, сидре, виноматериалах. Они придают готовому продукту неприемлемые вкус и запах в связи с образованием значительных количеств эфиров, диацетила, уксусной кислоты, серосодержащих летучих кислот.

Saccharomyces validus (рис. 6.2, д) – клетки овальные или сильно удлинённые, располагаются попарно или небольшими скоплениями. Вызывают помутнение пива и неприятный специфический запах.

Вид *Hansenula anomalia* (рис. 6.2, е) – клетки круглые, эллипсо-видные, иногда колбасовидные или булабовидные. Дрожжи рода *Hansenula* образуют большое количество спиртов и эфиров, придавая пиву резкий запах. Подавляют развитие культурных дрожжей.

Вид *Pichia farinosa* (рис. 6.2, ж) – клетки округлые, овальные, располагаются одиночно или соединены в пары. Размеры клеток (4,0–7,5)×(3–6) мкм. Дрожжи этого вида, а также вида *P. membrani-faciens* образуют на поверхности пива белую пленку. Накапливают

в продукте альдегиды, эфиры, летучие кислоты, придающие пиву фруктовый или лекарственный привкус. При доступе воздуха во время розлива размножаются и вызывают помутнение пива.

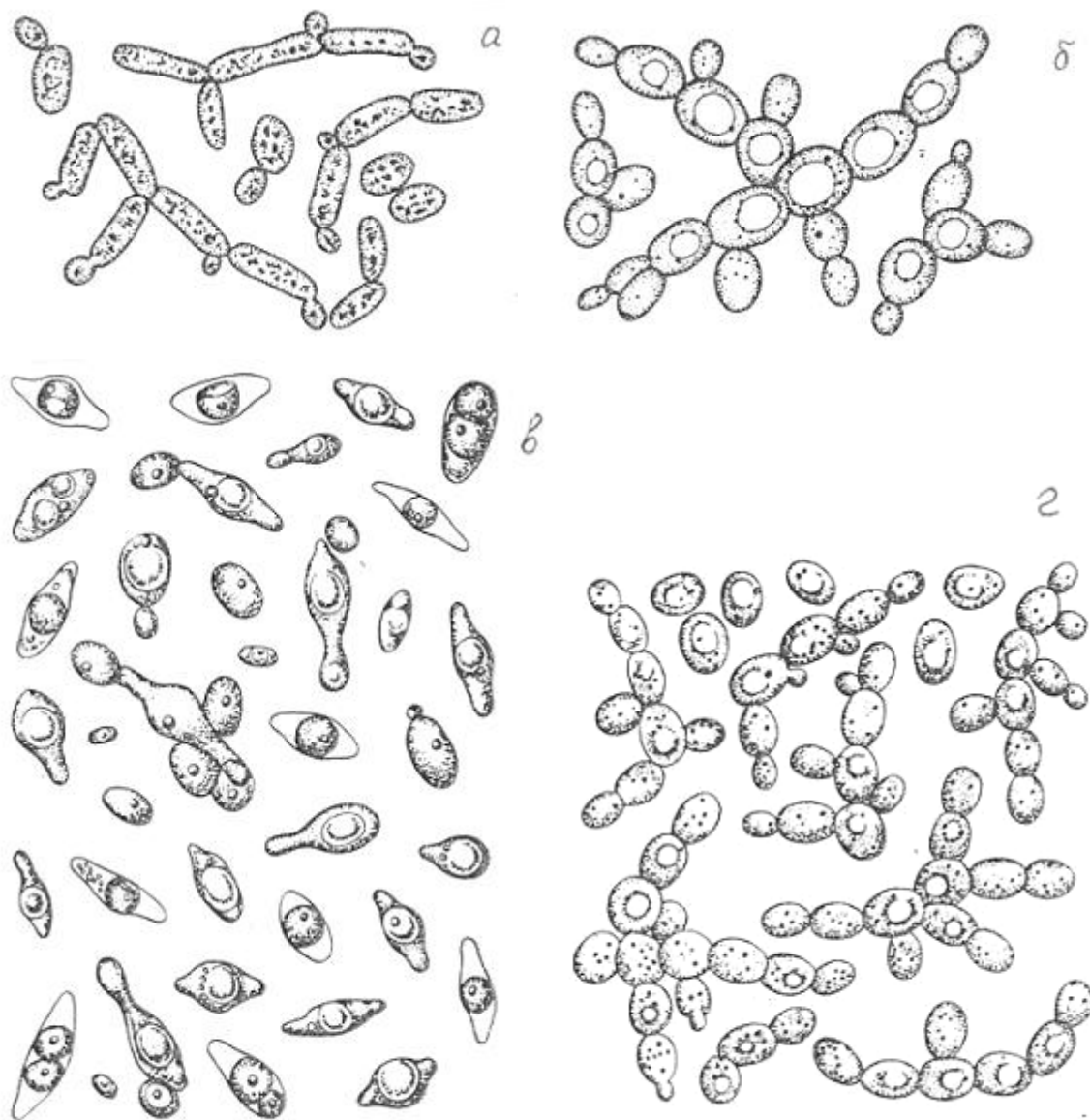


Рис. 6.2 (а – г). Некоторые представители диких дрожжей (Т.П. Слюсаренко, 1984):
а – *Saccharomyces pastorianus*; б – *Saccharomyces turbidans*;
в – *Kloecera apiculata*; г – *Saccharomyces bayanus*

Вид *Brettanomyces bruxellensis* (рис. 6.2, з) – клетки имеют разную форму: овальную, сильно удлинённую, палочковидную, иногда со стрелчато-заостренными концами. *B. bruxellensis* контаминируют сусло и пиво. Развитие этих дрожжей сопровождается появлением в пиве постороннего фруктового запаха и помутнения. Другие

виды (*B. anomalus*, *B. intermedius*) вызывают порчу пастеризованного пива, придавая ему специфический неприятный запах.

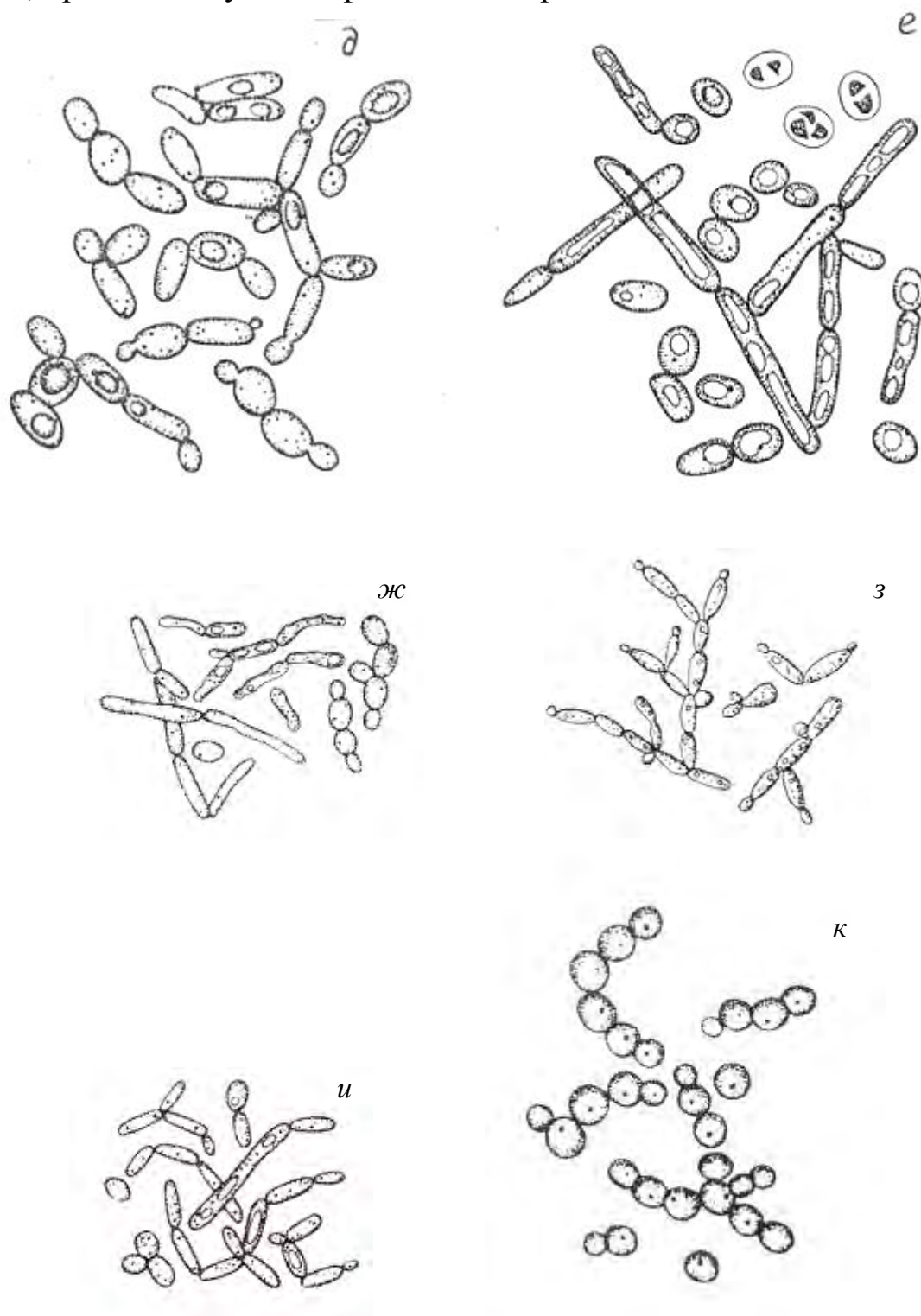


Рис. 6.2 (д – к). Некоторые представители диких дрожжей (Т.П. Слюсаренко, 1984):
 д – *Saccharomyces validus*; е – *Hansenula anomalia*; ж – *Pichia farinose*;
 з – *Brettanomyces bruxellensis*; и – *Candida mycoderma*; к – *Torulopsis colliculosa*

Род *Candida*. Основные представители этого рода – *C. mycoderma* (рис. 6.2, и), *C. utilis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* – имеют клетки овальные или удлинённо-цилиндрические. Размеры клеток $(4-16) \times (2-5)$ мкм. Дрожжи этого рода не образуют спор и являются аспорогенными. Многие представители этого рода являются вредителями в производстве вина, пива, пекарских дрожжей. На поверхности сусле и пива часто образуют плотную белую или сероватую сухую пленку. Вызывают помутнение пива, придают ему неприятный вкус и запах.

В процессе накопления биомассы при производстве пекарских дрожжей дрожжи рода *Candida* конкурируют с культурными дрожжами за питательные вещества субстрата, снижают мальтазную активность готовых дрожжей.

Род *Torulopsis*. Клетки дрожжей рода торулопсис мелкие, округлые или овальные, размерами $(5-8) \times (2-5)$. Дрожжи этого рода часто выделяют из кефирных грибков (*Torulopsis kefir*). Дрожжи вида *Torulopsis colliculosa* (рис. 6.2, к) являются вредителями пивоваренного и дрожжевого производства.

Вид *Rhodotorula roseum* – клетки округлые или овальные, одиночные, соединенные в пары, псевдомицелия не образуют. Размеры клеток $(5-8) \times (2,5-5,0)$ мкм. На питательном агаре *R. roseum* образует круглые блестящие колонии розового цвета. При размножении на поверхности пищевых продуктов вызывают их пигментацию.

6.2. Определение содержания мертвых и почкующихся клеток в суспензии дрожжей

Морфологическое состояние дрожжей определяют путем микроскопирования. С этой целью проводят подсчет числа почкующихся и мертвых клеток.

Определение количества мертвых клеток. Содержание мертвых клеток – важный показатель качества пивных и пекарских дрожжей. В дрожжах хорошего качества должно содержаться не более 5 % мертвых клеток. Увеличение количества мертвых клеток указывает на наличие неблагоприятных факторов при выращивании дрожжей. При значительном количестве мертвых клеток возможны нарушения технологического процесса: медленное брожение, развитие посторонних видов микроорганизмов.

При определении количества мертвых клеток дрожжей, культивируемых на неокрашенных питательных средах, удобно окрашивать их метиленовым голубым. Для этого готовят раствор красителя на дистиллированной воде в разведении 1:10000. Препарат готовят следующим образом: на предметное стекло наносят каплю исследуемой культуры, добавляют в нее каплю раствора метиленового голубого и накрывают покровным стеклом. На покровное стекло наносят каплю иммерсионного масла и микроскопируют с увеличением 90х. Мертвые клетки окрашиваются в голубой цвет, а живые остаются бесцветными. В 10 полях зрения приготовленного препарата подсчитывают число мертвых клеток (В).

Определение количества почкующихся клеток. На предметное стекло наносят каплю исследуемой суспензии дрожжей, добавляют каплю метиленового синего, размешивают и накрывают покровным стеклом. Рассматривают с объективом 60х или 90х. В поле зрения препарата общее число не должно превышать 30–40. В каждом поле зрения подсчитывают число почкующихся клеток (С) и общее число клеток (А). Почкой считают клетку, которая по величине не превосходит 1/2 материнской клетки. Клетку с почкой, размер которой меньше 1/3 материнской, считают за одну. При активном размножении дрожжей число почкующихся клеток достигает 50 % и более. Малое количество почкующихся форм указывает на низкую активность размножения дрожжей. Подсчет общего количества и почкующихся клеток проводят не менее чем в 10 полях зрения.

Результаты опыта заносят в табл. 6.1 и рассчитывают процентное содержание мертвых и почкующихся клеток в исследуемой суспензии дрожжей.

Таблица 6.1

Результаты подсчета клеток дрожжей в 10 полях зрения

Число клеток	Поля зрения										Средне-арифметическое значение A, B, C
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A – общее											
B – мертвых											
C – почкующихся											

Содержание мертвых клеток в исследуемой суспензии дрожжей:

$$X = B/A \cdot 100, \%$$

Содержание почкующихся клеток в исследуемой суспензии дрожжей:

$$Y = C/A \cdot 100, \%$$

6.3. Окрашивание запасных питательных веществ, содержащихся в дрожжевых клетках

Окрашивание гликогена. В молодых культурах дрожжей откладывается большое количество запасного питательного вещества – гликогена. В нормально «упитанных» дрожжах от 70 до 75 % клеток содержат гликоген. Меньшее количество клеток с гликогеном в производственных дрожжах свидетельствует о старости дрожжевых клеток или о недостаточном их питании.

Для обнаружения гликогена на предметное стекло наносят пипеткой каплю суспензии дрожжей, добавляют небольшое количество раствора йода. Суспензию накрывают покровным стеклом, на него наносят каплю кедрового масла и рассматривают препарат с иммерсионным объективом. Гликоген окрашивается в красно-бурый цвет, клетки дрожжей бесцветны.

Окрашивание липидов. В старых культурах дрожжей обычно накапливается большое количество липидов. Синтез липидов у дрожжей сахаромикетов имеет место при избытке углеводного питания, интенсивной аэрации и отсутствии азота в питательной среде. Липиды синтезируются также при наличии ингибиторов в среде.

1-й метод. Для окрашивания липидов на предметное стекло пипеткой наносят каплю суспензии дрожжей, в нее добавляют каплю спиртового раствора краски Судан III и накрывают покровным стеклом. На стекло палочкой наносят кедровое масло и микроскопируют с объективом 90х. Капли жира окрашены в желтый цвет, а клетки дрожжей бесцветны.

2-й метод. На предметное стекло наносят небольшую каплю 40 %-го раствора формалина. Петлей в каплю вносят культуру

дрожжей. Формалин убивает клетки и делает оболочку более проницаемой. Через 5 мин добавляют небольшую каплю метиленового синего, еще через 10 мин – каплю Судана III. Препарат накрывают покровным стеклом, избыток жидкости удаляют фильтровальной бумагой и микроскопируют с иммерсионным объективом. Цитоплазма окрашивается в синий цвет, а капельки жира – в розово-оранжевый.

Окрашивание полифосфатов по Леффлеру. Полифосфаты часто называют также метакроматиновыми зернами или зернами волютина. Для обнаружения полифосфатов готовят фиксированный препарат дрожжей и окрашивают его метиленовым синим. В вакуолях полифосфаты окрашены в красно-фиолетовый цвет. Цитоплазма дрожжевых клеток окрашивается в голубой цвет.

6.4. Спорообразование у дрожжей

Аскоспорогенные дрожжи в неблагоприятных условиях могут образовывать аскоспоры. Для спорообразования необходимы определенные условия:

- молодой возраст культуры (предварительное выращивание на богатых средах в течение 1–2 суток;
- высев активно растущих дрожжей на голодные среды (среда Городковой);
- инкубация на голодной среде в течение 2–4 недель при температуре несколько ниже оптимальной (20–25 °C) при еженедельном микроскопировании.

В дрожжевой клетке или в аске образуется от 1 до 8 аскоспор.

Окрашивание спор дрожжей. Для окрашивания спор берут культуру дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae*, выращенную предварительно в течение 2 недель на среде Городковой. Готовят фиксированный препарат, заливают его карболовым фуксином Циля и нагревают в течение 2–3 мин в пламени спиртовки до появления паров. Затем препарат обесцвечивают, погружая его в 2 %-й раствор молочной кислоты или в 95 %-й этанол, содержащий 1 % концентрированной соляной кислоты. Препарат промывают водой и докрашивают в течение 3–5 мин 1 %-м раствором метиленового синего, после чего снова промывают водой и осушают фильтровальной бумагой. На препарат наносят иммерсионное масло и рассматривают с объективом 90х.

Зрелые аскоспоры окрашиваются в красный цвет, вегетативные клетки – в синий.

Среда Городковой для образования аскоспор содержит в 1 л водопроводной воды (г): пептон – 10, хлорид натрия – 5,0; глюкоза – 1,0; агар – 20. Устанавливают рН среды 7,3 и стерилизуют в течение 15 мин при давлении 0,1 МПа.

Контрольные вопросы

1. Какие виды дрожжей используют в производстве пива, вина, хлеба?
2. Какие виды дрожжей являются вредителями пивоваренного и хлебопекарного производств?
3. Каковы морфологические признаки молодых, старых и мертвых клеток дрожжей?
4. Какие запасные питательные вещества содержатся в цитоплазме дрожжевых клеток? Как их можно обнаружить?
5. При каких условиях дрожжи образуют споры?

7. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ БАКТЕРИЙ

Цель работы: ознакомиться с морфологией бактерий.

При определении вида бактерий (идентификации) используют совокупность признаков, в том числе морфологических (от греч. *morphus* – форма), к которым относятся форма и размеры клеток, окрашивание по Граму, подвижность (наличие или отсутствие жгутиков), способность образовывать эндоспоры и капсулы.

7.1. Формы бактерий

По внешнему виду различают три основные формы бактерий: шаровидные (кокки), палочковидные (цилиндрические) и извитые (рис. 7.1). Среди извитых форм бактерий встречаются возбудители инфекционных заболеваний, поэтому они являются объектами изучения медицинской микробиологии.

Шаровидные бактерии имеют форму правильного шара, но некоторые из них по форме напоминают свечу, ланцет, бобы, кофейное зерно. В зависимости от расположения клеток (после деления) кокки подразделяют на:

м и к р о к о к к и (от греч. *micros* – малый) – одиночные или беспорядочно расположенные клетки;

д и п л о к о к к и (от греч. *diplos* – двойной) – располагаются парами, так как клетки после деления не расходятся (лактококки);

с т р е п т о к о к к и (от греч. *streptos* – витой, плетеный) – клетки округлой или вытянутой формы, составляющие цепочку вследствие деления клеток в одной плоскости и сохранения связи между ними;

т е т р а к о к к и (от греч. *tetra* – четыре) – сочетания по четыре кокка;

с а р ц и н ы (от лат. *sarcino* – соединяю) – пакеты кокков, образующиеся при делении их в трех взаимно перпендикулярных плоскостях и состоящие из 8 или более клеток;

с т а ф и л о к о к к и (от греч. *staphyle* – виноградная гроздь) – скопления клеток, напоминающие гроздь винограда в результате деления в разных плоскостях;

г о н о к о к к и (возбудители гонореи) имеют форму кофейных зерен, соединенных по два и обращенных друг к другу вогнутыми сторонами;

пневмококки и менингококки по форме напоминают пламя свечи и располагаются попарно широкими основаниями вовнутрь.

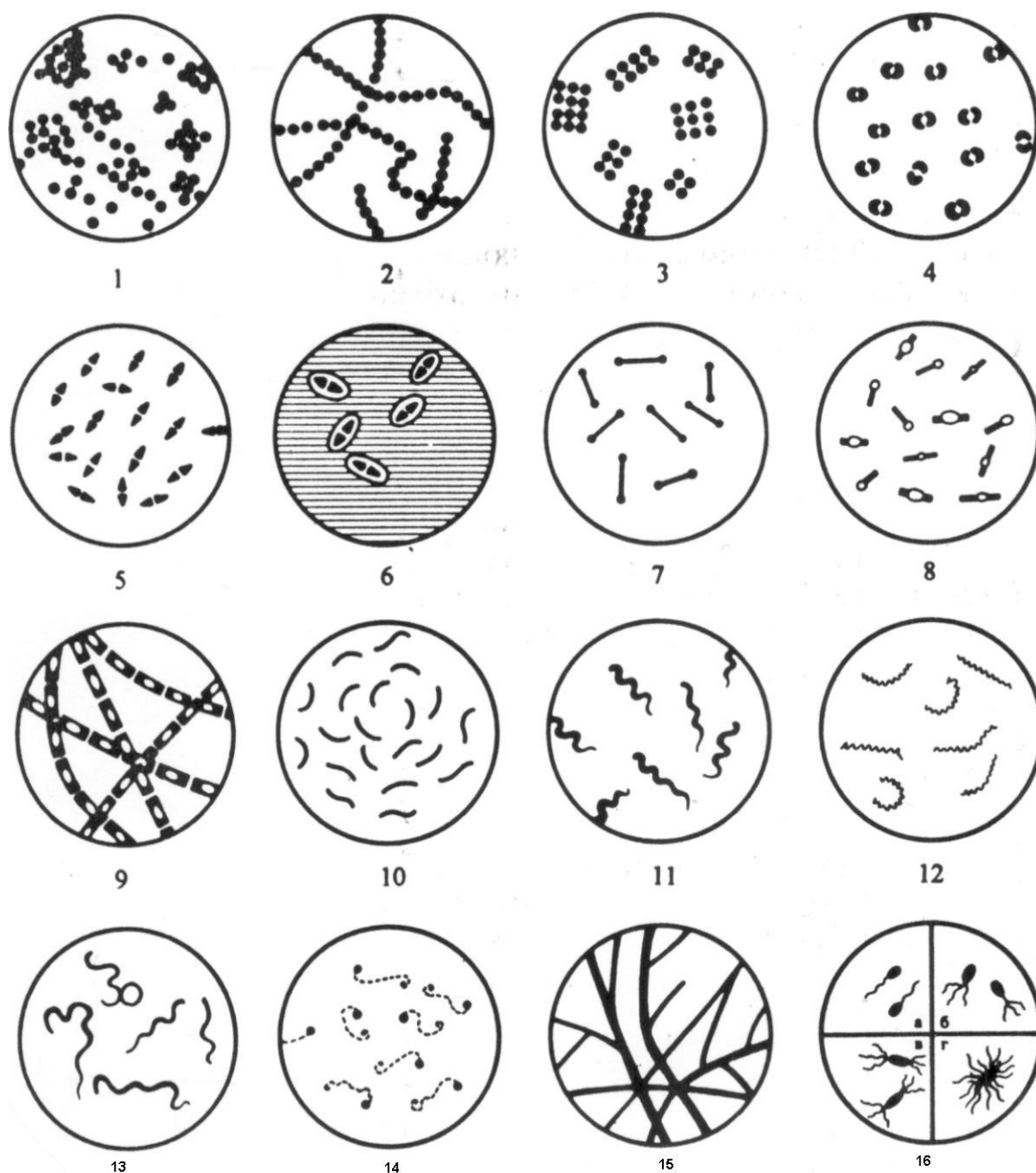


Рис. 7.1. Основные формы бактерий (Воробьев и др., 1994):

1 – стафилококки; 2 – стрептококки; 3 – сарцина; 4 – гонококки;
5 – пневмококки; 6 – капсула пневмококков; 7 – коринебактерии дифтерии;
8 – клостридии; 9 – бациллы; 10 – вибрионы; 11 – спириллы; 12 – трепонемы;
13 – боррелии; 14 – лептоспиры; 15 – актиномицеты; 16 – расположение жгути-
ков: а – монотрихи; б – лофотрихи; в – амфитрихи; г – перитрихи

Палочковидные бактерии имеют цилиндрическую форму различной длины и диаметра и различаются также по форме концов клетки и взаимному расположению клеток. Концы палочек бывают обрезанными (сибиреязвенная палочка), заостренными (фузобактерии), закругленными (кишечная палочка), имеющими утолщения на концах и напоминающие булаву (коринебактерии дифтерии).

Палочки могут располагаться одиночно, парами, цепочками, частоколом, розеткой. Среди палочковидных бактерий встречаются виды, образующие эндоспоры – бациллы (от лат. *bacillus* – палочка) и клостридии (от греч. *closter* – веретено), и не образующие спор – бактерии (псевдомонады, кишечные палочки, сальмонеллы, палочки протей и др.)

Возбудители дифтерии, относящиеся к роду коринебактерий, характеризуются наличием на концах палочек зерен полифосфатов. Палочки, образующие ветвистые формы, относят к микобактериям (микобактерии туберкулеза, актиномицеты, бифидобактерии).

Извитые бактерии. К извитым формам относятся:

в и б р и о н ы (от лат. *vibrio* – изогнутый) – слегка изогнутые палочки, по форме напоминающие запятую (холерный вибрион);

к а м п и л о б а к т е р ы – клетки имеют изгибы, как у крыла чайки;

с п и р и л л ы – слабо извитые формы, клетки имеют 3–5 завитков;

с п и р о х е т ы – сильно извитые формы – тонкие, длинные, извитые клетки со множеством завитков. Среди спирохет встречаются виды, патогенные для человека. Это представители родов лептоспира (*Leptospira*), трепонема (*Treponema*), боррелия (*Borrelia*).

7.2. Окрашивание бактерий по Граму

Все бактерии по этому признаку разделяются на две группы:

- красящиеся по Граму – грамположительные;
- не красящиеся по Граму – грамотрицательные.

В основе метода лежат различия в химическом составе и строении клеточной стенки бактерий.

Сущность метода основана на различии в химическом составе и строении клеточной стенки бактерий.

Техника окрашивания бактерий по Граму

1. На обезжиренное предметное стекло нанести в трех местах три капли воды и приготовить три тонких мазка разных видов бактерий: по краям контрольные (с заведомо известным отношением их к окраске по Граму), а в центре – мазок исследуемой культуры.

2. Мазки высушить и зафиксировать в пламени спиртовки.

3. Мазки окрасить в течение 1 мин генцианвиолетом (положить на предметное стекло полоску фильтровальной бумаги, пропитанной красителем, и смочить ее водой).

4. Бумажку с красителем удаляют и, не промывая препарат водой, наносят на него раствор Люголя. Выдерживают в течение 1 мин (до полного почернения мазка).

5. Препарат, не промывая водой, обрабатывают 96 %-м спиртом в течение 15–20 с, при этом предметное стекло следует непрерывно покачивать. Очень важно четко придерживаться времени обесцвечивания, так как при его превышении обесцвечиваются и грамположительные бактерии.

6. Препарат промывают водой, накладывают на него полоску фильтровальной бумаги, пропитанной фуксином Пфейфера, смачивают ее водой и окрашивают в течение 1 мин.

7. Бумажку с красителем удаляют, препарат промывают водой, осушают фильтровальной бумагой.

8. На препарат наносят кедровое масло и рассматривают с иммерсионным объективом.

После такой обработки грамположительные бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет, а грамотрицательные – в красный.

Грамположительными являются микрококки, стрептококки, стафилококки, бациллы, клостридии, молочнокислые бактерии. К грамотрицательным относятся кишечные палочки, сальмонеллы, бруцеллы, возбудители дизентерии, холеры, уксуснокислые бактерии, псевдомонады и др.

7.3. Обнаружение подвижности бактерий

Многие виды бактерий способны к самостоятельному движению благодаря наличию у них жгутиков. Расположение жгутиков и их количество является одним из диагностических признаков при определении вида бактерий.

Для обнаружения подвижности бактерий готовят препараты «висячая капля» или «раздавленная капля», используя молодые (односуточные) бульонные культуры бактерий. При наблюдении под микроскопом в поле зрения хорошо видно активное перемещение отдельных клеток в разных направлениях и с разной скоростью.

7.4. Окрашивание спор бактерий

Благодаря особенностям своего строения споры бактерий обладают высокой устойчивостью к различным неблагоприятным факторам внешней среды. При обычной обработке препарата метиленовым синим споры не окрашиваются и выглядят как бесцветные круглые, овальные или эллипсовидные тельца, хорошо преломляющие свет. Это объясняется тем, что оболочка споры обладает большой плотностью, характеризуется высоким содержанием липидов и в самой споре отсутствует свободная вода. Методы окрашивания спор основаны на применении протравливающих веществ (обычно слабых кислот, разрыхляющих оболочку споры) и дальнейшей окраске мазка красителем при нагревании. Окрасившийся протопласт споры удерживает краситель прочнее, чем цитоплазма клетки, поэтому он, в отличие от цитоплазмы, не обесцвечивается при последующей обработке кислотой. Обесцвеченную цитоплазму дополнительно окрашивают контрастным красителем.

Метод Циля – Нильсена

1. Готовят обычным способом фиксированный препарат бактерий.
2. На препарат наносят 5 %-й раствор хромовой кислоты и выдерживают в течение 5–10 мин.
3. Кислоту смывают водой, на препарат наносят полоску фильтровальной бумаги и обильно смачивают ее карболовым фуксином. Подогревают препарат над пламенем спиртовки до появления паров (не доводя до кипения), затем отводят его в сторону и добавляют новую порцию красителя. Эту процедуру проводят в течение 5–7 мин. Важно, чтобы краситель не испарялся и бумага не подсыхала.
4. После охлаждения предметного стекла бумагу снимают, препарат промывают водой и обрабатывают 1 %-м раствором соляной или серной кислоты в течение 15–30 с. При приготовлении препарата

спорообразующих палочек *B. subtilis*, *B. mycoides* или *B. mesentericus* цитоплазму клеток рекомендуется обесцвечивать в течение 16–18 с.

5. Препарат окрашивают метиленовым синим в течение 1–2 мин, затем краситель смывают, препарат осушают фильтровальной бумагой и рассматривают с иммерсионным объективом.

При такой обработке препарата споры окрашиваются в красный цвет, а вегетативные клетки – в синий.

Метод Пеикова

1. На приготовленный фиксированный препарат наливают метиленовый синий Леффлера и, держа стекло над пламенем, кипятят в течение 15–20 с, не допуская высыхания краски.

2. Мазок промывают водой и докрашивают 0,5 %-м раствором нейтрального красного в течение 30 с.

3. Препарат промывают водой, осушают и рассматривают с иммерсионным объективом.

При этом методе окраски споры окрашиваются в голубой или синий цвет, а цитоплазма клеток – в розовый.

Для идентификации бактерий важно выяснить тип спорообразования (бацилярный, клостридиальный или плектридиальный), расположение эндоспоры в клетке (полярное, центральное, эксцентриальное), форму свободных спор (округлые, овальные, цилиндрические). Для этой цели используют двух- или трехсуточные культуры спорообразующих бактерий.

7.5. Выявление капсул у бактерий

Некоторые микроорганизмы, особенно при росте на богатых углеводами средах, образуют капсулы. Наличие капсулы является диагностическим признаком при идентификации бактерий. При обычных методах окрашивания бактерий капсулы остаются бесцветными. Для выявления капсул применяют специальные методы окраски.

Окраска капсул по методу Гинса–Бурри. Жидкая черная тушь разводится дистиллированной водой в соотношении 1:10. Каплю суспензии бактерий смешивают на предметном стекле с каплей разведенной туши, тщательно размешивают и распределяют тонким слоем на поверхности стекла. Препарат высушивают на воздухе и рассматривают с иммерсионным объективом. На дымчато-темном фоне препарата бактериальные клетки окружены бесцветными капсулами.

Контрольные вопросы

1. Какие методы исследования морфологии бактерий Вам известны?
2. В чем заключается сущность и техника окраски бактерий по Граму?
3. Каковы особенности окрашивания спор бактерий?
4. Какими методами можно установить подвижность бактерий?
5. Каким методом пользуются для выявления капсул у бактерий?

8. ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ БАКТЕРИЙ

Цель работы: рассмотреть культуральные и физиолого-биохимические признаки бактерий, выращенных на различных питательных средах.

8.1. Культуральные признаки бактерий

Культуральные признаки бактерий выявляют по особенностям их роста на различных жидких и плотных питательных средах. Каждый вид микробов образует на плотных средах колонии определенного размера, соответствующей формы.

Колонии характеризуют по размеру, форме, профилю, контуру края, поверхности, цвету, структуре и консистенции.

Размер колонии определяется ее диаметром, в зависимости от которого различают точечные колонии – диаметр менее 1 мм, мелкие – диаметр 1–2 мм, средние – от 2 до 9 мм, крупные – 10 мм и более.

Форма колонии бывает округлой, неправильной, амёбовидной, розетковидной, концентрической и т.д. (рис. 8.1).

Профиль колонии характеризуется приподнятостью ее над поверхностью питательной среды и контуром формы в вертикальном разрезе. Определяется профиль колонии при визуальном изучении сверху и сбоку. Различают плоские, выпуклые, кратерообразные, конусовидные, каплевидные колонии (рис. 8.2).

Край колонии определяют при рассмотрении его через лупу или в микроскоп с увеличением 8х. Различают следующие контуры края колоний: ровный, волнистый, бахромчатый, зубчатый, фестончатый, лопастной, реснитчатый, ворсинчатый, ветвистый, ризоидный и др.

Поверхность бывает гладкой или шероховатой, сухой или влажной, бороздчатой, складчатой, морщинистой, бархатистой, бугристой, с концентрическими кругами или радиально исчерченная.

Оптические свойства: прозрачная, полупрозрачная, непрозрачная, флуоресцирующая.

Цвет колонии определяется пигментом, который синтезируется данным видом микроорганизма. В зависимости от типа образуемого пигмента колонии микроорганизмов могут быть окрашены в красный, розовый, желтый, золотисто-оранжевый, желто-зеленый, синий, черный цвет.

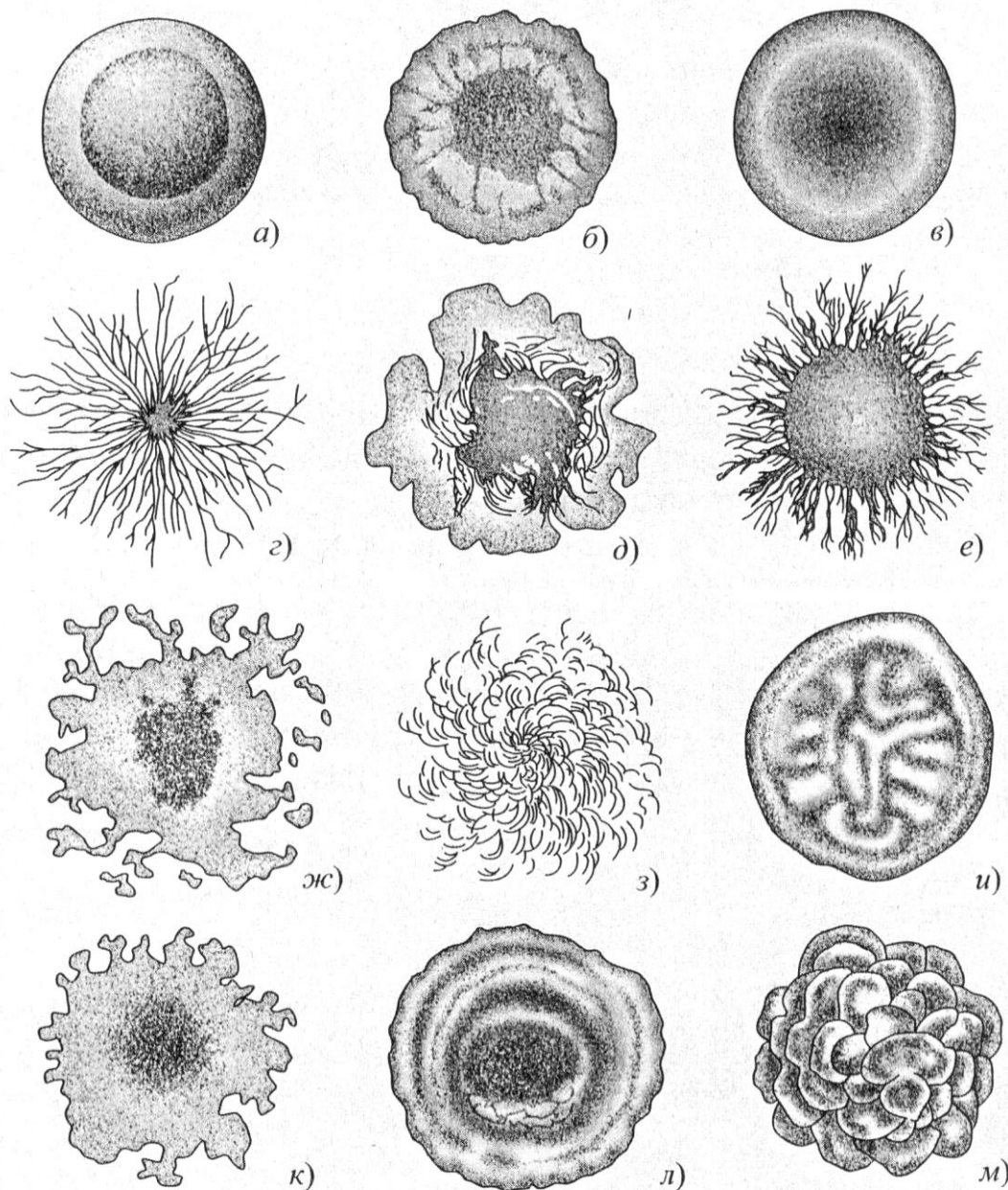


Рис. 8.1 . Формы колоний микроорганизмов:

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

Структура колонии бывает однородной, мелко- или крупно-зернистой, мучнистой, пленчатой, врастающей в агар.

Консистенция может быть пастообразной, легко снимающейся петлей, вязкой или слизистой, прилипающей и тянувшейся за петлей; плотной; волокнистой; тестообразной; сметанообразной; сухой, сни-

мающейся с поверхности агара в виде упругой пленки; хрупкой, рассыпающейся при прикосновении петлей. Консистенцию колонии устанавливают, прикасаясь к ее поверхности петлей.

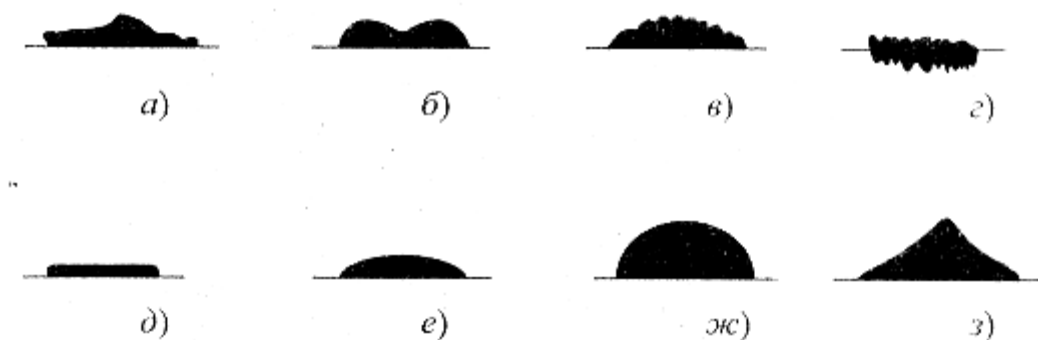


Рис. 8.2. Профиль колоний микроорганизмов:

а – изогнутый; *б* – кратеровидный; *в* – бугристый; *г* – врастающий в агар;
д – плоский; *е* – выпуклый; *ж* – каплевидный; *з* – конусовидный

При посеве микроорганизмов *штрихом* отмечают интенсивность роста (обильный, умеренный, слабый), особенности штриха (затягивающий, ветвистый, бугристый), оптические свойства поверхности, цвет, консистенцию.

Для характеристики роста бактерий в жидких средах производят посевы культур в мясопептонный бульон или другую среду, обеспечивающую их хороший рост. Для описания роста используют 4–7-суточные культуры, выращенные в стационарных условиях. В первую очередь отмечают интенсивность роста (скудный, умеренный, обильный). Затем обращают внимание на помутнение среды (однородное, хлопьевидное, с шелковистой волнистостью), наличие пленки (толстая или тонкая, сухая или слизистая, гладкая или складчатая, кольцеобразная или сплошная). Если культура пигмента не образует, то цвет среды не изменяется, а осадок приобретает, как правило, серовато-белый или желтовато-коричневый цвет. Нередко рост микроорганизмов в жидкой среде сопровождается появлением запаха, выделением газа. Газообразование обнаруживается по появлению пузырьков или пены.

8.2. Физиолого-биохимические признаки бактерий

При изучении физиолого-биохимических признаков бактерий исследуют их отношение к кислороду, ферментативную активность, способность расщеплять различные углеводы с накоплением определенных продуктов метаболизма.

Отношение к кислороду воздуха. По отношению к кислороду воздуха микроорганизмы делят на облигатные аэробы, микроаэрофилы, факультативные анаэробы и облигатные анаэробы. Об отношении бактерий к кислороду судят по росту культуры при посеве ее уколом в столбик с питательным агаром. Аэробы развиваются в верхней части укола, анаэробы – в нижней части, а факультативные анаэробы – равномерно по всему уколу.

Среди биохимических свойств культуры наиболее важно определение их ферментативной активности.

Использование углеводов и спиртов культурами микроорганизмов определяют путем посева 0,1–0,2 см³ суспензии исследуемых клеток в пробирки с жидкой или полужидкой средой, содержащей углевод и индикатор. Для обнаружения образования газа при расщеплении углеводов в жидкую среду опускают поплавки. Набор сред с углеводами и индикатором называют «цветным» рядом Гисса. Название «цветной» ряд связано с тем, что под действием ферментов клеток одни сахара расщепляются с накоплением кислоты или щелочи, за счет чего изменяется цвет индикатора и среды, другие сахара не расщепляются, и цвет среды не изменяется. Короткий ряд Гисса включает среды с глюкозой, лактозой, сахарозой, мальтозой и маннитом. В длинный ряд дополнительно вводят среды с арабинозой, ксилозой, рамнозой, галактозой, а также полисахариды (инулин, крахмал, декстрин) и спирты (глицерин, дульцит, инозит).

Засеянные пробирки помещают в термостат при оптимальной температуре. Результаты учитывают через 2–4 сут (для медленно растущих микроорганизмов – через 7–10 сут). Отмечают изменение цвета индикатора или отсутствие изменения цвета среды, а также появление или отсутствие газа в поплавке.

На основании полученных данных делают вывод, какие сахара ассимилирует исследуемая культура бактерий.

Протеолитическая активность. Микроорганизмы, обладающие протеолитической активностью, разжижают желатин, пептони-

зируют молоко. Для определения этого признака культуру исследуемых бактерий засевают уколом в пробирки с желатином и культивируют в течение 4–10 сут при комнатной температуре, отмечая при этом скорость разжижения и его характер: послойный, воронкообразный, пузырчатый и т.п. (рис. 8.3).

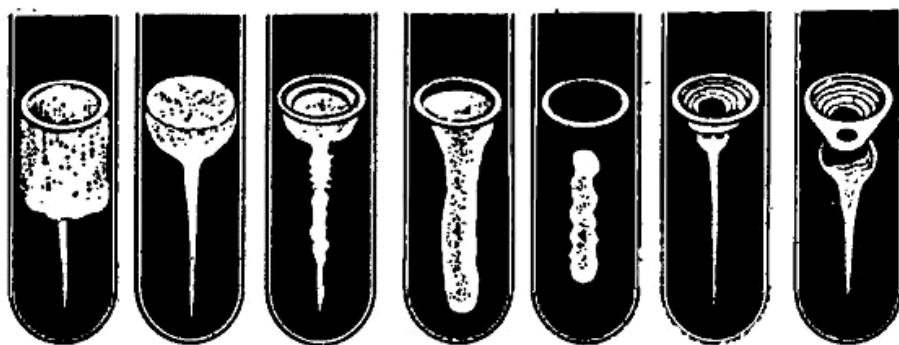


Рис. 8.3. Характер разжижения желатина протеазами исследуемых бактерий

Каталазная активность. Фермент каталазу образуют многие аэробные микроорганизмы. Для проведения исследования каплю 10 %-го раствора пероксида водорода наносят на колонию микроорганизма, выросшую в течение 24 ч на плотной среде в чашке Петри. Выделение кислорода в виде пузырьков газа свидетельствует о наличии в клетках бактерий каталазы.

Характер роста в молоке. Обезжиренное молоко разводят водой в соотношении 4:1, добавляют индикатор бромкрезоловый пурпурный (2 см³ 1,6 %-го спиртового раствора на 1 дм³ молока) или лакмус (10 см³ 4 %-го раствора на 1 дм³ молока), разливают в пробирки емкостью 8–10 см³ и стерилизуют в автоклаве при 0,05 МПа в течение 20 мин. Пробирки с молоком засевают исследуемой культурой бактерий и культивируют 6–14 сут при оптимальной температуре. Образование кислот микроорганизмами при расщеплении лактозы отмечают по изменению цвета индикатора. Если кислота накапливается в значительном количестве, то образуется сгусток. Бактерии, обладающие активными протеазами, расщепляют казеин, вызывая пептонизацию молока.

Образование индола. Некоторые микроорганизмы обладают способностью расщеплять аминокислоту триптофан с образованием индола, что также является диагностическим признаком при определении вида бактерий. Для определения индола применяют метод Мореля. Пробирки с 8–10 см³ стерильного мясопептонного бульона с добавлением 0,01 %-го триптофана (или без него) засевают исследуемой культурой бактерий. Под ватной пробкой укрепляют полоску фильтровальной бумаги, пропитанную щавелевой кислотой. Пробирки инкубируют при оптимальной температуре в течение 24 ч. При образовании индола нижняя часть полоски окрашивается в розовый цвет.

Образование аммиака. Аммонификация белковых веществ под влиянием ферментов микроорганизмов сопровождается выделением аммиака. Эту способность бактерий устанавливают путем засева исследуемой культуры в пробирки с мясопептонным бульоном, которые инкубируют в течение 2–3 сут в термостате при температуре 37 °С. Образование аммиака определяют по изменению окраски полоски лакмусовой бумажки, укрепленной между пробкой и горлышком пробирки таким способом, чтобы полоска не касалась питательной среды. Выделение аммиака обозначается изменением цвета лакмусовой бумажки из красного в синий.

Образование сероводорода. При расщеплении микроорганизмами серосодержащих аминокислот (цистеин, метионин) образуется сероводород. Для определения образования сероводорода пробирки с мясопептонным бульоном засевают исследуемой культурой бактерий и под пробкой укрепляют полоску фильтровальной бумаги, пропитанную раствором ацетата свинца. Засеянные пробирки помещают в термостат при оптимальной температуре на 7–10 сут. Выделение сероводорода фиксируют по почернению полоски вследствие образования сернистого свинца.

На основании морфологических, культуральных и физиолого-биохимических признаков выделенной культуры определяют ее видовую принадлежность, пользуясь определителем бактерий Берджи.

Исследования по идентификации бактерий оформляют в форме протокола (табл. 8.1).

В необходимых случаях проводят изучение других признаков, например, способность к восстановлению нитратов, образование оксидазы и т.д.

Таблица 8.1

**Характеристика культуры по морфологическим, культуральным
и физиолого-биохимическим признакам**

Тест или признак	Результат
<i>Морфологические признаки</i> Форма и расположение клеток Окрашивание по Граму Образование эндоспор Образование капсул Подвижность	
<i>Культуральные признаки</i> Морфология колоний Характер роста в МПБ Характер роста в молоке	
<i>Физиолого-биохимические признаки</i> Отношение к кислороду воздуха Наличие каталазы Протеолитическая активность Образование сероводорода Образование аммиака Образование индола Рост на среде Гиса, содержащей: глюкозу лактозу сахарозу мальтозу маннит	

Контрольные вопросы

1. Какие признаки используются при определении вида бактерий?
2. По каким признакам характеризуют колонии бактерий на плотной питательной среде?
3. Как характеризуется рост бактерий в жидкой среде?
4. Как выявляется протеолитическая активность бактерий?
5. Как определить способность бактерий сбраживать сахара?
6. Какие изменения могут наблюдаться при развитии бактерий в молоке и как их объяснить?
7. Какие признаки свидетельствуют об образовании бактериями аммиака, сероводорода, индола?

9. ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Цель работы: выделить из природных субстратов (капустный и огуречный рассол, растения, фрукты, рыночные кисломолочные продукты) чистые культуры мезофильных лактококков и лактобацилл и определить их свойства.

Выделение чистой культуры микроорганизмов из исследуемого материала включает три этапа:

- 1) получение накопительной культуры;
- 2) выделение чистой культуры;
- 3) определение чистоты выделенной культуры.

9.1. Получение накопительной культуры

Накопительной называют культуру, в которой доминируют представители одной группы или даже одного вида микроорганизмов. Для получения накопительной культуры необходимо создать *элективные* условия, которые обеспечат преимущественное развитие выделяемой группы микроорганизмов.

Молочнокислые бактерии (МКБ) весьма требовательны к источникам питания, и не все их представители растут даже в такой богатой питательной среде, как молоко. Поскольку МКБ в отличие от других бактерий устойчивы к спирту, элективной средой для них может также служить неохмеленное сусло, содержащее 10–15 об.% этилового спирта.

С целью получения накопительной культуры мезофильных МКБ источник выделения помещают в пробирку со стерильным обезжиренным молоком и термостатируют в течение 24 ч при температуре 30 ± 1 °С. После инкубации из свернувшегося молока готовят фиксированный окрашенный препарат, просматривают его и при наличии в микроскопической картине клеток, характерных для МКБ, используют для выделения чистой культуры. Обычно для получения накопительной культуры молочнокислых бактерий в пробирки со стерильным обезжиренным молоком делают 2–3 пассажа.

9.2. Выделение чистой культуры

Для выделения чистой культуры МКБ на плотную среду методом Коха делают высев из накопительной культуры. Принцип метода

закljučается в получении чистой культуры из изолированной колонии, которую считают потомством одной клетки.

С целью получения изолированных колоний МКБ в стерильном физиологическом растворе готовят десятикратные разведения накопительной культуры, после чего стерильной пипеткой наносят одну каплю соответствующего разведения этой культуры (10^{-3} или 10^{-4}) на поверхность плотной питательной среды в чашке Петри (гидролизованное молоко с 1,5 % агара или сусло-агара). Материал осторожно размазывают стерильным стеклянным шпателем по всей поверхности среды. Разведение готовят с таким расчетом, чтобы в одной чашке выросло не более 20–30 колоний. Затем этим же шпателем во второй чашке протирают поверхность плотной среды. Засеянные чашки выдерживают в термостате при температуре 30 ± 1 °C в течение 2–3 сут, после чего рассматривают и анализируют выросшие колонии.

Внешний вид и строение колоний являются важными культуральными признаками при определении вида микроорганизмов, так как каждому виду присуща типичная форма колонии. Колонии изучают невооруженным глазом в проходящем и отраженном свете и под микроскопом при малом увеличении (8х). В проходящем свете колонии рассматривают со стороны дна чашки. Отмечают величину колоний (точечные – менее 1 мм, мелкие – 1–2 мм, средние – 2–4 мм, крупные – от 4–5 мм и более), их форму (правильная, круглая, неправильная, плоская, сферическая) и прозрачность. В отраженном свете, рассматривая колонию со стороны крышки, определяют цвет, характер поверхности (гладкая, бугристая, блестящая, матовая), профиль колонии (выпуклый, плоский, вдавленный).

Важно определить тип колонии. Различают два основных типа колоний бактериальной культуры:

а) колонии гладкие – *S*-тип (от англ. *smooth* – гладкий), характеризующиеся круглой и выпуклой формой, гладкой поверхностью, влажной консистенцией;

б) колонии шероховатые – *R*-тип (от англ. *rough* – шероховатый), характеризующиеся шероховатой поверхностью, неправильными краями, сухой консистенцией. Образуются из гладких *S*-форм в результате мутации.

Помимо этих двух основных типов колоний существует так называемый слизистый *M*-тип (от лат. *mucus* – слизистый), характе-

ризующийся тягучей слизистой консистенцией; образуется в процессе диссоциации бактериальных культур.

Для дальнейшей работы с чистой культурой по одной изолированной колонии МКБ пересевают в пробирки со стерилизованным обезжиренным молоком. Посевы термостатируют при оптимальной температуре в течение 18–24 ч (но не более 48 ч).

Примечание. Иногда бывает достаточно одного посева на плотную питательную среду для получения изолированных колоний. Однако чаще посев на плотную среду повторяют 2–3 раза, используя в качестве посевного материала выросшие на чашках отдельные колонии.

9.3. Определение чистоты выделенной культуры

Чистоту выделенной культуры определяют несколькими способами – визуальным, микроскопическим и высевом на ряд питательных сред.

При визуальном методе отмечают однотипный характер роста колоний на плотной среде.

Для микроскопического исследования чистоты культуры готовят фиксированные окрашенные препараты и просматривают их с иммерсионным объективом. В микроскопическом препарате должны обнаруживаться морфологически и тинкториально однородные клетки.

Чистоту выделенной культуры МКБ проверяют также путем посева на ряд питательных сред, таких как сусло, гидролизованное молоко, питательный агар с мелом или цитратом кальция и др.

9.4. Идентификация выделенной культуры молочнокислых бактерий

Идентификацию выделенных культур МКБ проводят путем изучения их морфологии, культуральных, биохимических и других признаков, присущих каждому виду.

Из рыночных кисломолочных продуктов – творога и сметаны – обычно выделяются мезофильные лактококки.

В капустном и огуречном рассоле доминирующими видами лактобацилл являются *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. Buchneri*.

Морфологические признаки: МКБ имеют форму клеток шаровидную или палочковидную. Шаровидные клетки располагаются одиночно, попарно (диплококки), в виде длинных или коротких цепочек. Палочки различаются по длине и толщине. МКБ грамположительны, в основном неподвижны, не образуют спор и капсул.

Культуральные и физиолого-биохимические признаки. На поверхности плотной питательной среды культуры *Lactococcus lactis* образуют мелкие (диаметром 1–2 мкм), каплевидные, блестящие, бесцветные колонии с ровными краями. Глубинные колонии имеют форму лодочки или чечевицы. *Lactococcus cremoris* образуют мелкие округлые колонии с выраженной зернистостью. Культуры *Lactococcus diacetylactis* на агаре с гидролизованным молоком и лимоннокислым кальцием образуют вокруг колоний зоны просветления, что свидетельствует о наличии фермента цитритазы, характерного для ароматобразующих лактококков.

С целью дифференциации лактококков от энтерококков (молочнокислых кокков кишечного происхождения) проводят ряд дополнительных тестов. В отличие от энтерококков лактококки и лейконостоки не растут в гидролизованном молоке, содержащем 6,5 % NaCl при температуре 45 °С и при pH среды 9,5 (табл. 9.1).

Таблица 9.1

Дифференцирующие признаки лактококков и энтерококков

Признаки	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus cremoris</i>
Рост при температуре 45 °С	+	–	–
Терморезистентность при температуре 65 °С с выдержкой в течение 30 мин	+	–	–
Продолжительность свертывания молока при внесении 3 %-й культуры, ч	20–24	5–7	6–8
Рост в среде с 6,5 %-м NaCl	+	–	–
Рост в среде с pH 9,6	+	–	–
Сбраживание:			
мальтозы	+	+	–
маннитола	+	–	±

Оптимальная температура размножения мезофильных лактококков и лактобацилл – от 28 до 32 °С. Активные штаммы лактококков свертывают молоко при оптимальной температуре за 5–7 ч с образованием ровного, плотного сгустка.

Предельную кислотность в молоке определяют путем титрования молока 0,1 н. раствором NaOH после ферментации его исследуемой культурой в течение 7 сут при оптимальной температуре. У лактококков предельная кислотность не превышает 115–120 °Т, в мезофильных лактобациллах она составляет 160–180 °Т, а в термофильных лактобациллах она может достигать 250–300 °Т.

Молочнокислые бактерии – факультативные анаэробы. Не содержат фермента каталазы, но могут расти в присутствии кислорода воздуха.

Культуральные и биохимические признаки некоторых видов лактококков приведены в табл. 9.2.

Таблица 9.2

**Основные культуральные и биохимические признаки
лактококков и лейконостокков**

Признаки	<i>Lac. lactis</i>	<i>Lac. cremoris</i>	<i>Lac. diacetylactis</i>	<i>Leu. cremoris</i>
Рост в среде с 4 %-м NaCl	+	–	+	–
Образование:				
NH ₃ из аргинина	+	–	+	–
CO ₂ из глюкозы	–	–	–	+
диацетила	–	–	+	+
Время свертывания молока, ч	5–7	6–8	Более 16	Более 24
Рост в лакмусовом молоке	BC*	BC	BC	Без изменения
Предельная кислотность в молоке, °Т	115–120	110–115	80–100	50–80

*BC – восстанавливает, свертывает.

Для определения принадлежности выделенных лактобактерий к группе гомо- или гетероферментативных их высевают в среду с глюкозой или лактозой и после термостатирования устанавливают наличие или отсутствие газа в поплавке.

Лактобациллы вида *L. plantarum* относятся к подроду стрептобактерий. Они свертывают молоко за 2–3 сут, предельная кислотность составляет 160–180 °Т. Лактобациллы этого вида растут в гидролизованном молоке, содержащем 6 % NaCl и 20 % желчи, восстанавливают и свертывают лакмусовое молоко, не образуют аммиака из

аргинина. Глюкозу расщепляют по гексозодифосфатному пути с образованием преимущественно молочной кислоты.

Культуральные и биохимические признаки некоторых видов лактобацилл приведены в табл. 9.3.

Лактобациллы видов *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. buchneri* относятся к подроду бетабактерий, вызывающих гетероферментативное молочнокислородное брожение с образованием молочной и уксусной кислот, этанола и диоксида углерода.

Таблица 9.3

Основные культуральные и биохимические признаки лактобацилл

Признаки	<i>L. plantarum</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. buchneri</i>
Рост в среде с 6 %-м NaCl	+	—	—	—
Образование:				
NH ₃ из аргинина	—	+	+	+
CO ₂ из глюкозы	—	+	+	+
Время свертывания молока	2–3 сут	Не свертывается	Не свертывается	Не свертывается
Рост в лакмусовом молоке	BC	P*	P	P
Предельная кислотность в молоке, °T	160–180			

P* – порозовение (частичное восстановление).

Бетабактерии не свертывают молоко, но при добавлении в него дрожжевого автолизата их размножение стимулируется и предельная кислотность может составить от 150 до 160 °T. Большинство видов бетабактерий образуют аммиак из аргинина, не свертывают лакмусовое молоко и лишь частично его восстанавливают (порозовение).

10. МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО УЧЕТА МИКРООРГАНИЗМОВ

Число клеток микроорганизмов в единице объема или массы продукта можно определить либо непосредственным их подсчетом под микроскопом, либо путем подсчета колоний, выросших на питательных средах при посеве разведений продукта, или другими методами.

Кроме того, в микробиологической практике часто определяют биомассу – массу сухого вещества клеток, выраженную в граммах, выросшую в определенном объеме питательной среды. Непосредственный подсчет клеток проводят в счетных камерах, на фиксированных окрашенных мазках и на мембранных фильтрах. При непосредственном подсчете микроорганизмов под микроскопом учитывают как живые, так и мертвые клетки, что дает завышенные результаты о числе жизнеспособных клеток в субстрате.

10.1. Подсчет клеток микроорганизмов в камере Горяева

Цель работы: произвести подсчет клеток суспензии дрожжей в камере Горяева.

В камерах Горяева, Тома–Цейса и других можно произвести подсчет только крупных клеток микроорганизмов – дрожжей, одноклеточных водорослей, конидий грибов и некоторых крупных бактерий.

Счетная камера Горяева представляет собой толстое предметное стекло, разделенное четырьмя прорезями на три поперечные площадки. Центральная площадка продольной прорезью делится пополам. На каждой половинке выгравирована сетка. Площадь квадрата сетки и глубина камеры указаны на предметном стекле и равны соответственно $1/25$ (большой квадрат) и $1/400$ мм² (малый квадрат). Глубина камеры равна 0,1 или 0,2 мм.

Суспензию дрожжей перед подсчетом клеток разбавляют водой в зависимости от предполагаемой их концентрации. На поверхность сетки камеры Горяева наносят небольшую каплю исследуемой суспензии микроорганизмов, накрывают специальным шлифованным покровным стеклом и притирают его к боковым площадкам до появления так называемых Ньютоновых колец. Подсчет клеток рекомен-

дуются начинать не раньше чем через 3–5 мин после заполнения камеры, чтобы клетки осели и расположились в одной плоскости. Клетки подсчитывают с объективом 8х или 40х. Для получения достоверных результатов подсчет следует проводить в 10 больших или 20 маленьких квадратах сетки, перемещая последние по диагонали, при этом количество клеток в большом квадрате не должно превышать 20, а в малом – 10. В противном случае суспензию следует развести водопроводной водой.

Количество клеток в 1 см^3 суспензии вычисляют по формуле

$$C = a \cdot 1000 \cdot n / h S,$$

где C – число клеток в 1 см^3 суспензии; a – среднее число клеток в квадрате сетки; $1000\text{ мм}^2 = 1\text{ см}^2$; n – разведение исходной суспензии; h – глубина камеры в мм; S – площадь квадрата сетки в мм^2 .

10.2. Непосредственный подсчет клеток под микроскопом (метод Виноградского–Брида)

Цель работы: произвести подсчет клеток лактобацилл в кисломолочном продукте.

Преимущество этого метода, по сравнению с учетом клеток в счетной камере, заключается в возможности подсчитывать клетки микроорганизмов малых размеров, так как подсчет проводят с использованием иммерсионного объектива.

Препарат готовят следующим образом. Хорошо обезжиренное предметное стекло помещают на миллиметровую бумагу, на которой отмечают квадрат площадью 4 см^2 , и обводят его стеклогграфом или тушью. Готовят суспензию микроорганизмов, для чего 1 см^3 кисломолочного продукта вносят в пробирку с 9 см^3 физиологического раствора ($n = 10$). Затем на предметное стекло наносят микропипеткой строго определенный объем исследуемой суспензии микроорганизмов (обычно $0,01$ или $0,02\text{ см}^3$). Тщательно распределяют суспензию бактериологической петлей по всей площади квадрата, отмеченного на стекле. Препарат подсушивают на воздухе, фиксируют в пламени спиртовки, окрашивают в течение 2 мин метиленовым синим, промывают водой и осушают фильтровальной бумагой. На препарат наносят каплю кедрового масла и рассматривают с иммерсионным объективом. Чтобы результат был достоверным, подсчет числа

клеток рекомендуется проводить не менее чем в 20 полях зрения. Общее количество подсчитанных клеток должно быть не менее 600. В мазке микроорганизмы распределяются неравномерно: в центре их содержится больше, чем по краям. Поэтому для получения среднего значения следует вести подсчет по диаметру мазка, смещая поле зрения от одного конца диаметра к другому.

Количество клеток в 1 см³ суспензии вычисляют по формуле

$$C = a \cdot S \cdot n / s \cdot V,$$

где C – число клеток в 1 см³ суспензии; a – среднее число клеток в одном поле зрения; S – площадь приготовленного мазка (400 мм²); n – разведение исходной суспензии; s – площадь поля зрения (0,02 мм²); V – объем нанесенной на предметное стекло суспензии микроорганизмов (0,01 или 0,02 см³).

10.3. Прямой подсчет количества микроорганизмов флуоресцентным методом

Флуоресцентная микроскопия основана на способности некоторых биологических объектов люминесцировать, т.е. светиться при освещении ультрафиолетовым или синим светом вследствие того, что свет люминесценции обладает большей длиной волны, чем поглощенный (правило Стокса). При этом объекты будут светиться желто-зеленым или оранжевым светом. Это собственная или первичная люминесценция. Поскольку большинство микроорганизмов не обладает собственной люминесценцией, существует несколько способов их обработки для наблюдения в люминесцентном микроскопе. Прежде всего это окрашивание их специальными красителями флуорохромами – сильно разбавленными растворами флуоресцирующих красителей. Из синтетических флуорохромов наилучшие результаты дают акридин желтый или оранжевый, корифосфин, примулин, родамин. Такой вид люминесценции в отличие от первичной носит название наведенной (вторичной).

Люминесцентная микроскопия по сравнению с обычной позволяет:

- сочетать цветное изображение и контрастность объектов;
- исследовать как прозрачные, так и непрозрачные живые объекты;

- изучать морфологию как живых, так и мертвых клеток микроорганизмов;
- исследовать клеточные микроструктуры, избирательно поглощающие различные флуорохромы, и определять функционально-морфологические изменения клеток;
- исследовать различные жизненные процессы в динамике их развития.

Микробные клетки окрашивают акридиновым оранжевым и концентрируют их на фильтрах методом центрифугирования или фильтрования. В проходящем свете с длиной волны 450 нм живые бактерии светятся зеленым светом, а мертвые – оранжево-красным. Подсчет численности бактериальных клеток в ходе микроскопирования ведется одновременно по отдельным морфологическим признакам, что дает возможность охарактеризовать как состав сообщества, так и общую численность микроорганизмов (кл/см³) в исследуемом объекте.

Люминесцентная микроскопия широко используется в медицинской микробиологии для диагностики возбудителей туберкулеза, дифтерии, гонореи, возвратного тифа и др.

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

В настоящее время для исследований применяют следующие модели люминесцентных микроскопов, выпускаемых отечественной промышленностью: ЛЮАМ 3–8, МЛД–2, ЕС БИАМ Р–11, ЕС БИАМ Р–13.

К главным недостаткам люминесцентной микроскопии относятся низкое разрешение при подсчете мелких бактериальных клеток (размером менее 1 мкм) и, следовательно, пропуск их большей части, большое напряжение зрения при подсчете мелких клеток, а также затемненные условия микроскопирования.

10.4. Метод проточной цитометрии

Проточная цитометрия (ПЦ) является современной технологией быстрого оптического измерения параметров клетки, ее органелл и происходящих в ней процессов. Принцип метода ПЦ основан на ре-

гистрации флюоресценции и светорассеяния от каждой отдельно взятой клетки. Клеточная суспензия, предварительно меченная флюоресцентными красителями, под давлением подается в проточную ячейку, где за счет гидродинамического фокусирования клетки, находясь в ламинарном потоке, выстраиваются в цепочку друг за другом. В момент пересечения клеткой лазерного луча высокочувствительные детекторы регистрируют интенсивность ее флюоресценции и рассеянное лазерное излучение. В ходе анализа учитывается также уровень флюоресценции химических соединений, входящих в состав клетки (аутофлюоресценция). Полученный сигнал подается в компьютер, обрабатывается, и полученные данные отображаются в виде различных графиков или гистограмм. Аппарат для проведения ПЦ позволяет определять до 5–10 различных параметров клетки, таких как размер, активность ферментов, содержание белков, ДНК, липидов, антигенных веществ.

Метод ПЦ находит самое различное применение, начиная от простого подсчета клеток и определения их жизнеспособности и заканчивая более сложными исследованиями в иммунологии, онкологии, цитологии, гематологии, фармакологии.

10.5. Определение количества микроорганизмов методом мембранного фильтрования

Сущность метода состоит в том, что определенный объем исследуемой пробы (питьевой воды, стойких безалкогольных напитков, пастеризованного пива) фильтруют через мембранные фильтры с размером пор от 0,15 до 0,25 мкм (см. раздел 10.3). Осевшие на фильтре микроорганизмы окрашивают и подсчитывают под микроскопом с применением окулярного сетчатого микрометра в нескольких полях зрения на определенной площади препарата. Подсчет численности бактериальных клеток в ходе микроскопирования ведется одновременно по отдельным морфологическим группам, что дает возможность охарактеризовать как состав микробного сообщества, так и (после суммирования данных) общую численность микроорганизмов в исследуемом объекте.

10.6. Определение количества микроорганизмов методом подсчета колоний (чашечный метод)

Цель работы: определить количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов в пищевом продукте.

Чашечный метод широко применяется для определения численности жизнеспособных клеток микроорганизмов в различных естественных субстратах и в лабораторных культурах. В основе метода лежит принцип Коха, согласно которому каждая колония является потомством одной клетки. Однако необходимо учитывать, что для микроорганизмов, образующих цепочки или другие скопления клеток, результаты всегда несколько занижены. Поэтому при использовании чашечного метода результат выражают не числом клеток в единице массы или объема, а количеством *колониеобразующих единиц* (КОЕ). В отличие от прямого подсчета клеток под микроскопом этот метод дает возможность определить только число жизнеспособных клеток.

Определение чашечным методом числа микроорганизмов включает следующие этапы: отбор проб и подготовку их к анализу, приготовление разведений микробной суспензии, посев в чашки Петри на плотную среду, инкубацию посевов при оптимальной температуре, подсчет выросших колоний и обработку результатов.

В качестве питательной среды для учета бактерий используют мясопептонный агар, на котором могут расти только сапрофитные аэробные и факультативно анаэробные бактерии, но неспособны расти строго анаэробные. Дрожжи и мицелиальные грибы обычно выращивают на сусло-агаре.

10.7. Учет живых микроорганизмов методом предельных разведений

Метод предельных разведений применяется для установления количества микроорганизмов отдельных физиологических групп (молочнокислых, уксуснокислых бактерий, кишечных палочек и др.). Сущность метода состоит в том, что делается ряд десятикратных разведений исследуемого материала. Количество разведений готовится в зависимости от предполагаемого содержания бактерий в исследуе-

мом объекте таким образом, чтобы в последних разведениях данных бактерий не было. Материалом, взятым из приготовленных разведений, засевают определенное число пробирок с питательной средой. После инкубации при оптимальной температуре визуально устанавливают, в каком наименьшем количестве исследуемого материала еще находятся представители данной группы микроорганизмов.

Например, при определении количества молочнокислых бактерий в кисломолочном продукте готовят ряд его последовательных разведений от 10^{-1} до 10^{-10} . Из каждого разведения в три пробирки со стерилизованным обезжиренным молоком параллельно засевают по 1 см^3 суспензий. Пробирки выдерживают в термостате при оптимальной температуре в течение 18–24 ч, после чего отмечают, в каких пробирках образовался сгусток за счет накопления молочнокислыми бактериями молочной кислоты. В параллельных посевах может получиться не один и тот же результат вследствие неравномерного распределения клеток в исследуемой пробе. В дальнейшем титр определяется с помощью специальных расчетных таблиц.

Если для определения числа живых микроорганизмов используют бульонную питательную среду, то после инкубации пробирки, в которых размножились микроорганизмы, окажутся мутными, а пробирки, засеянные разведениями, в которых уже не содержалось жизнеспособных микроорганизмов, останутся прозрачными. Доля пробирок, оказавшихся мутными при посеве культуры данного разведения, зависит от числа живых клеток в неразведенной культуре. По числу мутных пробирок в группах, засеянных суспензиями трех последовательных разведений, определяют с помощью соответствующих таблиц наиболее вероятное число (НВЧ) клеток микроорганизмов.

10.8. Нефелометрический метод определения биомассы

Нефелометрический (турбидиметрический) метод определения биомассы нашел широкое применение в лабораторных микробиологических исследованиях, поскольку позволяет быстро и довольно точно определить концентрацию клеток в суспензии микроорганизмов.

Нефелометрический метод основан на рассеивании пучка света взвешенными в жидкой фазе частицами. Данный метод пригоден лишь для тех микроорганизмов, рост которых вызывает равномерное

помутнение среды и при этом не происходит образования мицелия, пленок и других скоплений. Питательная среда, в которой культивируют микроорганизмы, должна быть оптически прозрачной.

Светорассеяние, вызываемое микроорганизмами, выросшими в питательном бульоне, наиболее удобно измерять с помощью фотоэлектроколориметра (ФЭК) или спектрофотометра (СФ) при длине волны от 540 до 650 нм, при которой поглощение света данной суспензией является минимальным.

Зависимость между интенсивностью падающего света (I_0) и прошедшего света I (т.е. света, не рассеянного культурой) при малых концентрациях бактерий подчиняется закону Ламберта–Бера:

$$I = I_0 10^{-\varepsilon lc},$$

где ε – коэффициент экстинкции, l – толщина слоя суспензии, c – концентрация бактерий. Из этого соотношения следует:

$$\lg(I_0/I) = \varepsilon lc.$$

График зависимости $\lg(I_0/I)$ от c (концентрации бактерий) имеет вид прямой, угол наклона которой определяется произведением εl . Таким образом, изменение оптической плотности, вызываемое изменением концентрации бактерий на одну единицу, зависит от толщины слоя суспензии l и свойств суспензии, характеризуемых коэффициентом ε .

При высоких концентрациях бактерий закон Ламберта–Бера теряет свою силу.

Для определения числа бактерий нефелометрическим методом строят калибровочные кривые зависимости между величиной светорассеяния и числом клеток (или сухой биомассы в единице объема среды). Для построения калибровочной кривой измеряют на ФЭК или СФ величину светорассеяния суспензии с различным содержанием клеток и в каждой из них определяют количество клеток и биомассы. Полученную зависимость выражают графически, откладывая на оси ординат показания ФЭК, а на оси абсцисс – количество клеток, содержащееся в 1 см³ суспензии, или биомассу в 1 дм³ культуральной среды. Для каждого микроорганизма необходимо строить свою калибровочную кривую.

Контрольные вопросы

1. Какие методы определения количества микроорганизмов в различных объектах вам известны?
2. С какой целью готовят серию разведений исследуемого объекта для определения общего количества микроорганизмов при использовании чашечного метода? Что такое КОЕ?
3. Все ли бактерии, находящиеся в исследуемом продукте, учитываются чашечным методом?
4. Какие питательные среды используют для определения в продукте количества бактерий и грибов (дрожжей и плесеней)?
5. Каковы достоинства и недостатки флуоресцентного метода подсчета микроорганизмов?
6. В чем заключается сущность метода проточной цитометрии?
7. На чем основан нефелометрический метод определения количества бактерий или биомассы в суспензии?

11. ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОФЛОРЫ ВОЗДУХА ПОМЕЩЕНИЙ

Цель работы: ознакомиться с методами микробиологического исследования воздуха помещений.

Оборудование, реактивы: аппарат Кротова, стерильные чашки Петри, питательные среды – мясопептонный агар, сусло-агар.

Воздух производственных помещений на предприятиях пищевой промышленности может стать источником инфицирования посторонними микроорганизмами сырья и готовой продукции. Обычно в воздухе находятся различные микрококки, сарцины, неспорообразующие палочки, дрожжи, споры бактерий и мицелиальных грибов, могут встречаться и болезнетворные микроорганизмы.

При микробиологическом исследовании в 1 м³ воздуха определяют общее количество микроорганизмов, наличие плесневых грибов, а при необходимости – группу санитарно-показательных микроорганизмов: гемолитический стрептококк (посев на кровяной агар) и золотистый стафилококк (посев на желточно-солевой агар).

Для определения количества микроорганизмов в воздухе используют различные методы. Наиболее распространенными являются седиментационный и аспирационный методы.

11.1. Седиментационный метод

Седиментационный метод (метод Коха) основан на оседании пылинок и капель вместе с микроорганизмами на поверхность питательной среды в открытых чашках Петри. Контроль воздуха помещений проводят следующим образом. Готовят две стерильные чашки Петри. Одну из них заливают расплавленным мясопептонным агаром (МПА), другую – сусло-агаром (СА). После застывания агара чашки переносят в исследуемое помещение, открывают крышки, сдвигают их на края бортиков так, чтобы вся поверхность питательной среды была открыта полностью. Чашки оставляют открытыми в течение 5, 10 или 15 мин в зависимости от степени загрязненности воздуха. Затем чашки закрывают, переворачивают вверх дном и помещают в термостат.

В н и м а н и е! Если чашки не переворачивать вверх дном, то конденсационная влага, выделяющаяся из агаризованной среды, бу-

дет попадать с внутренней стороны крышки на поверхность среды и размывать колонии микроорганизмов.

Чашки с МПА выдерживают при температуре 37 °С в течение 24 ч, а чашки с СА – при 30 °С в течение 48 ч.

Для определения количества микроорганизмов в 1 м³ воздуха пользуются формулой В.Л. Омелянского, согласно которой на поверхность чашки площадью 100 см² оседает в течение 5 мин столько микроорганизмов, сколько их содержится в 10 дм³ воздуха:

$$X = a \cdot 100 \cdot 5 \cdot 100 / ST,$$

где a – число колоний, выросших на чашке; 100 – пересчет площади чашки на 100 см²; 5 – экспозиция чашки по Омелянскому, мин; 100 – пересчет на 1 м³ воздуха; S – площадь чашки Петри (78,5 см²); T – время экспозиции открытой чашки, мин.

11.2. Аспирационный метод

Аспирационный метод (метод Кротова) основан на использовании щелевого аппарата конструкции Ю.А. Кротова. Прибор, смонтированный в портативном ящике, состоит из узла для отбора пробы, куда на специальную площадку помещают чашку Петри без крышки, электромотора, вентилятора и ротаметра. Вентилятор, вращаясь с частотой 4–5 тыс. об/мин, засасывает воздух, струя которого ударяется о поверхность питательной среды в чашке Петри, оставляя на ней микроорганизмы. Воздух выходит из прибора через ротаметр. Для равномерного распределения микроорганизмов на поверхности среды диск с чашкой вращается с частотой 60 об/мин. Скорость протягивания воздуха составляет 25 дм³/мин. При определении общей численности бактерий количество пропущенного воздуха должно составлять 100 дм³. Засеянные чашки вынимают из аппарата, закрывают их крышками, помещают на 24 ч в термостат при температуре 37 °С, затем вынимают и оставляют при комнатной температуре на 24 ч. Подсчитывают число выросших колоний и производят перерасчет на 1 м³ воздуха:

$$X = a / 1000 \cdot V,$$

где a – количество выросших на чашке колоний; V – объем пропущенного через прибор воздуха; 1000 – искомый объем воздуха, дм³.

Кроме количественной, дается качественная характеристика микрофлоры воздуха. Для этого проводят описание колоний бактерий, выросших на чашках Петри, и готовят микроскопические препараты из этих колоний. Описание колоний бактерий проводят, как это указано в разд. 5.3.

Результаты исследования оформляют в виде таблицы по форме табл. 11.1, микроскопические препараты из колоний зарисовывают в тетрадь.

Таблица 11.1

Изучение морфологии колоний бактерий, выросших на МПА

Характеристика колонии						
Размер	Форма	Профиль	Край	Поверх- ность	Цвет	Структура

Плесневые грибы, выросшие в чашке Петри с сусло-агаром, рассматривают визуально и под микроскопом с объективом 8х. Пользуясь описанием грибов, приведенным в разделе 5, определяют их принадлежность к определенному роду.

Санитарное состояние воздуха обследуемого помещения оценивают согласно санитарным нормам и правилам. В табл. 11.2 приведен фрагмент формы журнала санитарно-микробиологического контроля на предприятиях пищевой промышленности.

Таблица 11.2

Санитарно-микробиологический контроль на предприятии

Объект контроля	Микробиологическое определение	Допустимая норма	Периодичность контроля
Воздух цеха	Общее микробное число	200 колоний на чашке с МПА при седиментационном методе после 20 мин экспозиции; 150 колоний – при просасывании 100 дм ³ аппаратом Кротова	2 раза в месяц
Воздух цеха	Споры плесневых грибов	20 колоний на чашке с СА после 20 мин экспозиции и 15 колоний – по методу Кротова	2 раза в месяц

Пользуясь данными, приведенными в табл. 11.2, дать заключение о микробиологической чистоте воздуха обследованного помещения.

Контрольные вопросы

1. Какими методами производят микробиологический анализ воздуха помещений?
2. Каковы критерии санитарной оценки воздуха производственных помещений на предприятиях пищевой промышленности?
3. Какие микроорганизмы наиболее часто встречаются в воздухе помещений?

12. САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВОДЫ

Цель работы: изучение методов оценки санитарно-бактериологического состояния питьевой воды и воды из естественных водоемов.

Вода, используемая на предприятиях пищевой промышленности, должна отвечать требованиям, предъявляемым к питьевой воде действующими нормативными документами. Безопасность воды в эпидемиологическом отношении определяют по общему числу микроорганизмов и количеству бактерий группы кишечных палочек в ее определенном объеме.

Качество воды централизованных систем питьевого водоснабжения определяют в соответствии с санитарными правилами и нормами. Питьевая вода должна быть безопасна в эпидемиологическом и радиационном отношении, безопасна по химическому составу и иметь благоприятные органолептические свойства (табл. 12.1).

Таблица 12.1

**Безопасность питьевой воды в эпидемиологическом отношении
(по микробиологическим и паразитологическим показателям)
СанПиН 2.1.4.1074–01**

Показатели	Единица	Норматив
Общее микробное число (ОМЧ)	Число КОЕ в 1 см ³	Не более 50
Термотолерантные колиформные бактерии	Число бактерий в 100 см ³	Отсутствуют
Общие колиформные бактерии	Число бактерий в 100 см ³	Отсутствуют
Колифаги	Число БОЕ* в 100 см ³	Отсутствуют
Споры сульфитредуцирующих бактерий	Число спор в 20 см ³	Отсутствуют
Цисты лямблий	Число цист в 50 дм ³	Отсутствуют

* БОЕ – бляшкообразующие единицы.

12.1. Отбор проб и подготовка их к анализу

Воду для санитарно-бактериологического контроля отбирают в количестве 500 см³ в бутылки, предварительно простерилизованные в бумажных пакетах, с ватно-марлевой пробкой, покрытой сверху бумажным колпачком.

Перед отбором пробы кран или край трубы обжигают зажженным ватным тампоном, пропитанным спиртом. Открывают кран и в течение 10–15 мин воду спускают, затем производят отбор пробы. Вода подлежит анализу не позже чем через 2 ч после отбора.

Пробы воды из открытых водоемов – колодцев, бассейнов, рек, озер – отбирают с помощью батометров, представляющих собой металлический каркас с массивным свинцовым дном – грузилом. В металлический каркас вставлена бутылка. Батометр погружают на заданную глубину и открывают бутылку, потягивая за веревку, привязанную к пробке. После наполнения бутылки батометр извлекают и закрывают ее стерильной пробкой.

Пробы хлорированной воды берут во флаконы с дехлоратором, так как под действием хлора микробы в воде погибают. В качестве дехлоратора используют серноватистый натрий из расчета 10 мг на 500 см³ исследуемой воды.

К отобраным пробам воды прилагают сопроводительный документ с указанием соответствующих данных. Доставку проб питьевой воды осуществляют в контейнерах-холодильниках при температуре от 4 до 10 °С.

12.2. Определение общего микробного числа воды

Общее микробное число (ОМЧ) – это количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, образующих колонии на мясопептонном агаре при посеве 1 см³ воды с последующей инкубацией посевов при температуре 37±0,5 °С в течение 48 ч. ОМЧ должно быть не более 50 КОЕ/см³.

В зависимости от степени предполагаемого загрязнения производят посев не менее двух различных объемов воды, выбранных с таким расчетом, чтобы на чашках выросло от 30 до 300 колоний. Водопроводную и артезианскую воду засевают в неразведенном виде по 1 см³. При бактериологическом исследовании загрязненных вод делают посевы разведенной воды. Разведения готовят так, как указано в разделе 8.3.

Из исследуемого образца и из пробирок с его разведениями в соответствии со степенью предполагаемого микробного загрязнения отбирают по 1 см³, вносят в стерильные чашки Петри и заливают 10–12 см³ расплавленного и остуженного до температуры 45 °С мясопептонного агара. Круговыми движениями руки, вращая чашки по го-

горизонтальной поверхности стола, распределяют их содержимое равномерным слоем по всей площади дна. После застывания агара чашки с посевами помещают на 24 ч в термостат при температуре 37 °С. После инкубации подсчитывают число выросших колоний.

Определение микробного числа указанным методом позволяет выявить лишь мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы.

12.3. Определение содержания колиформных бактерий в воде

С эпидемиологической точки зрения особенно важным является обнаружение в воде патогенных микроорганизмов – возбудителей кишечных инфекций (брюшного тифа, дизентерии, холеры и др.) Однако в связи с большой трудностью обнаружения патогенных микроорганизмов при бактериологических анализах ограничиваются определением так называемых санитарно-показательных микроорганизмов (СПМ). К санитарно-показательным относят микроорганизмы, постоянно находящиеся в естественных полостях человека или животных. Присутствие СПМ в различных объектах внешней среды является индикатором их загрязнения человеком. Чем больше СПМ во внешней среде, тем более вероятным становится присутствие специфических возбудителей инфекционных заболеваний.

В качестве СПМ наибольшее значение имеют бактерии группы кишечных палочек (БГКП). К группе кишечных палочек относят *колиформные* бактерии родов *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*.

При определении количества СПМ в воде используют следующие характеристики:

- *коли-титр* – наименьший объем воды, в котором обнаружена одна кишечная палочка. Для питьевой воды, прошедшей очистку, титр кишечной палочки должен быть не менее 300 см³;

- *коли-индекс* – количество кишечных палочек в 1 дм³ воды. Коли-индекс для питьевой воды должен быть не более 3.

Колиформные бактерии определяют в воде методом мембранных фильтров или бродильным методом.

Бродильный метод. Сущность бродильного метода заключается в посеве определенных объемов исследуемой воды, инкубации

посевов при температуре 37 °С в средах накопления с последующим высевом на среду Эндо, дифференциацией выросших колоний и определением наиболее вероятного числа БГКП в 1 дм³ воды.

При исследовании воды централизованного водоснабжения исследуемый материал дважды засевают в три объема: 100, 10 и 1 см³. Для исследования речной, озерной, прудовой воды готовят десятикратные разведения 1:10, 1:100, 1:1000 и засевают еще 10 см³ и 1 см³ без разведения. Посев воды производят в бродильные сосуды (колбы, бутылки, пробирки с поплавками), заполненные глюкозопептонной средой Эйкмана. Посевы инкубируют в термостате при температуре 37 °С в течение 24 ч.

Обработка результатов анализа. По окончании инкубации посевы просматривают и делают следующие выводы:

а) при отсутствии газообразования и изменения цвета среды дают отрицательный ответ на наличие БГКП в исследуемом объеме воды, дающим право закончить исследование через 24 ч;

б) при образовании кислоты и газа производится высев материала из бродильных сосудов на среду Эндо. Высев делается бактериологической петлей густым штрихом для получения изолированных колоний. Чашки с посевами инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 ч. После инкубации посевы просматривают. Отсутствие на среде Эндо характерных для кишечных палочек колоний дает основание на выдачу отрицательного ответа и окончание исследования;

в) при обнаружении на среде Эндо лактозоположительных темно-красных колоний, с металлическим блеском или без него, необходимо установить принадлежность выросших микроорганизмов к семейству кишечных бактерий. С этой целью производится микроскопирование препарата из колоний и постановка *оксидазного* теста.

Оксидазный тест предложен для дифференциации бактерий семейства *Enterobacteriaceae* от грамотрицательных бактерий семейства *Pseudomonadaceae* и других водных сапрофитов, которые, в отличие от кишечных бактерий, вырабатывают фермент оксидазу.

Для постановки оксидазного теста со среды Эндо снимают петлей по 2–3 колонии каждого типа. Микробную массу наносят штрихом на фильтровальную бумагу, смоченную специальным реактивом (30 г α -д-нафтола растворяют в 2,5 см³ этанола, прибавляют 7,5 см³ дистиллированной воды и 40 мг диметил-парафенилендиамина. Раствор готовят непосредственно перед определением).

При отрицательном результате оксидазного теста бумага при контакте с колонией цвета не меняет. Если же бумага синее в течение 1 мин при контакте с колонией, то оксидазный тест считают положительным.

Наличие в препарате грамотрицательных неспорообразующих палочек, не обладающих оксидазной активностью, позволяет немедленно дать ответ о наличии в воде БГКП.

При обнаружении на среде Эндо розовых и бесцветных колоний ведут подсчет и пересевают 2–3 изолированные колонии каждого типа в глюкозо-пептонную среду Эйкмана. Посевы инкубируют при температуре 37 °С в течение 3–4 ч. При образовании кислоты (изменение цвета среды) и газа, накапливающегося в поплавке, результат считается положительным, при отсутствии кислото- и газообразования – отрицательным.

После проведения анализа записывают в лабораторный журнал окончательные результаты (положительные и отрицательные) по каждому засеянному объему и определяют коли-титр и коли-индекс.

Метод мембранных фильтров. Сущность метода заключается в концентрировании бактерий из определенного объема воды на мембранных фильтрах с последующим выращиванием их на среде Эндо при температуре 37 °С, дифференцированием выросших колоний и подсчетом количества БГКП в 1 см³ воды.

Подготовка мембранных фильтров. Для фильтрования воды отбирают мембранные фильтры № 3, помещают их в подогретую до температуры 80 °С дистиллированную воду и ставят на небольшой огонь для кипячения. Кипячение проводят трижды по 10 мин. После первого и второго кипячения воду сливают, а после третьего фильтры оставляют в воде до употребления.

Подготовка фильтровального аппарата. Фильтровальный аппарат стерилизуют в автоклаве или протирают ватным тампоном, смоченным в спирте, и обжигают в целях стерилизации. На столик фильтровального аппарата стерильным пинцетом помещают мембранный фильтр. Во избежание повреждения фильтра под него подкладывают кружок стерильной фильтровальной бумаги. На фильтровальный столик с положенными на него фильтрами устанавливают и закрепляют верхнюю часть прибора – воронку (рис. 12.1).

Фильтрование воды и выращивание микроорганизмов. В воронку фильтровального аппарата стерильно наливают исследуемый объем воды и с помощью водоструйного насоса создают вакуум

в приемном сосуде. При анализе питьевой воды, поступающей в водопроводную сеть, необходимо брать объем не менее 333 см³. По окончании фильтрования мембранный фильтр профламбированным пинцетом переносят на поверхность питательной среды Эндо в чашки Петри. В настоящее время выпускают фильтры, пропитанные соответствующими питательными средами. Посевы инкубируют в термостате при температуре 37 °С в течение 18–24 ч.

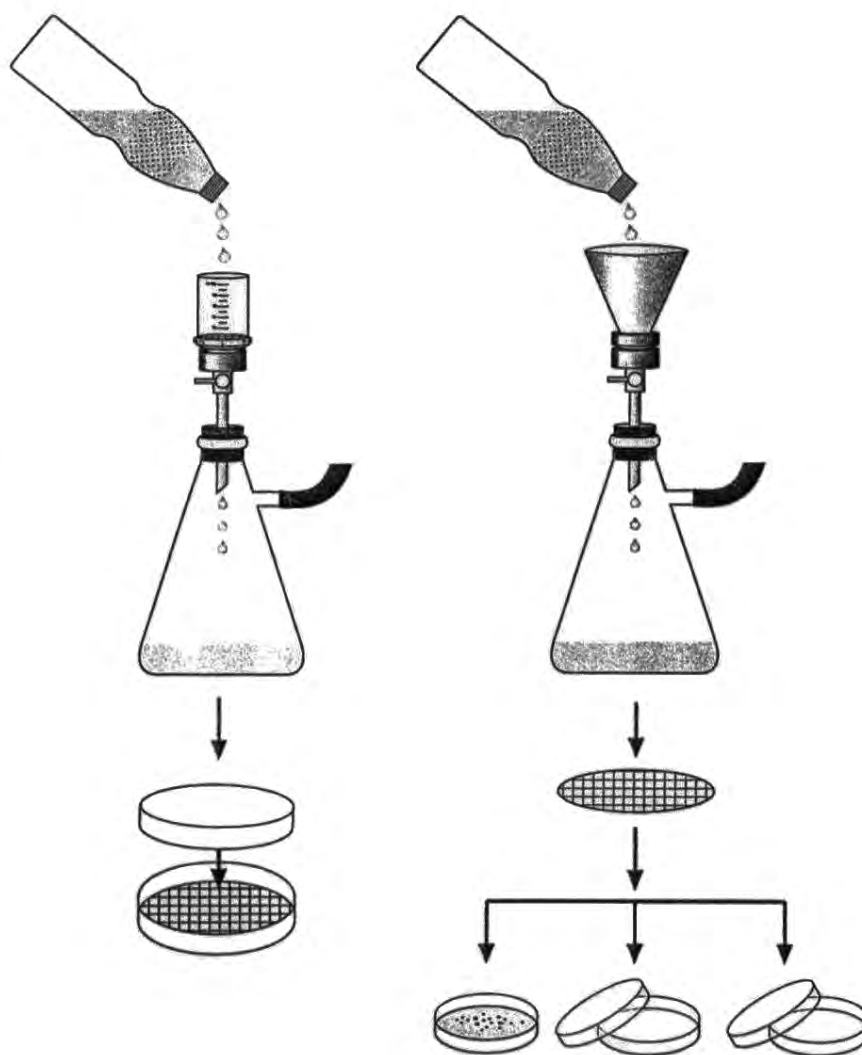


Рис. 12.1. Определение количества микроорганизмов методом мембранных фильтров

Обработка результатов анализа. По окончании инкубации посевы просматривают и делают следующие выводы:

а) отсутствие микробного роста на фильтрах или обнаружение на них колоний, не характерных для БГКП, позволяет закончить ис-

следования на этом этапе анализа с выдачей отрицательного результата на присутствие БГКП в анализируемом объеме воды;

б) при обнаружении на фильтре колоний, характерных для БГКП, исследование продолжают. Из нескольких колоний каждого типа готовят мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют. Отсутствие в мазках мелких грамотрицательных неспороносных палочек является основанием для прекращения анализа с выдачей отрицательного результата на присутствие БГКП в исследуемом объеме воды;

в) при наличии в мазках грамотрицательных палочек, морфологически сходных с кишечными, ставится оксидазная проба. При обнаружении на мембранных фильтрах одноклеточных лактозоположительных колоний (темно-красных с металлическим блеском или без него), не вырабатывающих оксидазы, анализ воды на этом этапе заканчивают и подсчитывают число выросших на мембранном фильтре колоний кишечных палочек. Результат выражают в виде колииндекса в пересчете на 1 дм³ воды;

г) при обнаружении на мембранных фильтрах розовых и бесцветных колоний подсчитывают их число и пересевают 2–3 изолированные колонии каждого типа в глюкозо-пептонную среду Эйкмана. После инкубации в течение 3–4 ч при температуре 37 °С отмечают изменение цвета среды за счет образования кислоты и накопления газа в поплавке. В этом случае результат считается положительным. Если изменений в среде нет, то дают отрицательный результат на присутствие БГКП.

Пример определения колииндекса: профильтровано три объема воды по 100 см³. На первом и втором фильтрах выросло по три колонии, на третьем – девять колоний. Всего выросло пятнадцать колоний. Таким образом, колииндекс исследуемого образца воды равен: $(1000 \times 15) : 300 = 50$. Колииндекс переводится в колититр следующим образом: $1000 : 50 = 20$.

Контрольные вопросы

1. Какие Вы знаете показатели эпидемиологической безопасности питьевой воды?
2. Что такое общее микробное число, колититр и колииндекс?
3. Какие роды микроорганизмов входят в БГКП?
4. Какими методами определяют колиформные бактерии?
5. Каковы основные критерии, по которым устанавливают присутствие колиформных бактерий в питьевой воде?
6. С какой целью проводят тест на оксидазу?

13. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЧВЫ

Цель работы: провести микробиологическое исследование почвы как источника контаминации пищевых продуктов посторонними микроорганизмами.

Почва обильно заселена микроорганизмами. В ней встречаются все формы микроорганизмов, которые существуют на Земле: бактерии, вирусы, актиномицеты, дрожжи, грибы, простейшие. Общее микробное число (ОМЧ) в 1 г почвы может достигать от 1,0 до 10 млрд. В разных слоях почвы количество микроорганизмов неодинаково. В самом верхнем слое (0,5 см) микроорганизмов очень мало. На глубине от 1–5 см до 30–40 см число микроорганизмов максимально – в среднем от 10 до 50 млн в 1 г. После 30–40 см глубины ОМЧ постепенно снижается и в более глубоких слоях оно минимально.

Микрофлору почвы делят на 2 группы:

- 1) аутотрофная – питается минеральными веществами;
- 2) гетеротрофная – питается органическими веществами.

Обе группы участвуют в процессах самоочищения почв, их минерализации. Однако в группе гетеротрофных микроорганизмов может присутствовать патогенная микрофлора. При загрязнении почвы фекалиями людей, больных кишечными инфекциями, продукты растительного происхождения могут быть контаминированы возбудителями дизентерии, холеры, брюшного тифа, сальмонеллеза, энтеровирусами. Установлена прямая зависимость между уровнем заболеваемости человека и животных кишечными инфекциями и неудовлетворительным санитарным состоянием почвы. Через почву передаются возбудители таких инфекционных заболеваний, как сибирская язва, газовая гангрена, столбняк и др.

При санитарно-микробиологическом анализе почвы определяют общее микробное число, колититр, перфрингенс-титр, титр нитрифицирующих бактерий и количество протеев и термофильных бактерий. Микробное число характеризует загрязненность почвы органическими веществами. Присутствие в почве бактерий группы кишечных палочек свидетельствует о ее фекальном загрязнении. Обнаружение в почве палочки *Clostridium perfringens* также указывает на ее фекальное загрязнение. Наличие в почве бактерий рода *Proteus* дает основание считать возможным загрязнение почвы органическими веществами животного происхождения или фекалиями человека. Присутствие термофильных микроорганизмов указывает на загряз-

нение почвы навозом или компостами. В чистых почвах термофильные микроорганизмы, как правило, не обнаруживаются.

Взятие проб почвы. При проведении микробиологических исследований поверхностных слоев почвы образцы берут на глубине 15–20 см, снимая верхний слой толщиной 2 см (из разных мест исследуемой территории не менее 10 проб). Отбирают пробы маленькой железной лопаткой или совком в стерильные широкогорлые банки, завернутые в бумагу и снабженные этикеткой. Каждый взятый образец должен весить 200–300 г, а смешанный образец (средняя проба) – не менее 1 кг.

Подготовка почвы для анализа. Образцы почвы освобождают от крупных включений, размельчают, просеивают через стерильное 3-миллиметровое сито, затем пробу почвы высыпают на стерильную бумагу, тщательно перемешивают и отвешивают 10 г. Навеску почвы помещают в колбу емкостью 250 см³ с 90 см³ стерильной водопроводной воды. Получают разведение 1:10, которое соответствует 0,1 г исследуемой почвы. Колбу встряхивают в течение 10 мин, дают отстояться грубым частицам почвы в течение 30 с и затем делают от 3 до 6 десятикратных разведений в зависимости от загрязненности почвы.

13.1. Определение микробного числа почвы

В две стерильные чашки Петри, слегка приоткрыв крышку, вносят по 1 см³ 10⁻⁴ и 10⁻⁵ разведений почвенной суспензии и затем заливают их расплавленным и охлажденным до 45 °С питательным агаром (МПА или картофельно-глюкозный агар). После застывания агара чашки помещают в термостат на 24–48 ч при температуре 37±2 °С, а затем выдерживают столько же при комнатной температуре. Подсчитывают число выросших на чашках колоний и определяют микробное число в 1 г почвы с учетом засеянного разведения.

13.2. Определение колититра почвы

Наличие бактерий группы кишечных палочек свидетельствует о свежем фекальном загрязнении почвы. Титром кишечной палочки (колититр) называют наименьшее количество почвы (в г), в котором обнаруживаются кишечные палочки. Колиндексом почвы называют количество кишечных палочек в 1 г почвы.

Для определения колититра по 1 см^3 разведений почвенной суспензии от 10^{-1} до 10^{-5} засевают в пробирки со средой Кесслера, в которых находятся поплавки. Посевы выдерживают в термостате при температуре 37°C в течение 18–24 ч, после чего отмечают накопление газа в поплавках.

13.3. Определение перфрингенс-титра почвы

Перфрингенс-титр – титр грамположительных облигатно-анаэробных спорообразующих палочек, восстанавливающих сульфиты. Присутствие *C. perfringens* (споровых форм) свидетельствует о давнем фекальном загрязнении.

Для определения перфрингенс-титра используют железо-сульфитный агар (среда Вильсона–Блера). Обнаружение *C. perfringens* на этой среде основано на способности данного микроорганизма восстанавливать $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ до Na_2S , который, взаимодействуя с хлорным железом, приводит к образованию сернистого железа (FeS), имеющего черный цвет.

Пробирки с разведениями почвенной суспензии прогревают на водяной бане с температурой $80\text{--}85^\circ\text{C}$ в течение 15 мин. Затем пробирки охлаждают до комнатной температуры и засевают по 1 см^3 разведений почвенной суспензии от 10^{-1} до 10^{-4} в пробирки с расплавленной и охлажденной до 45°C средой Вильсона–Блера. Вращением пробирки между ладонями почвенную суспензию равномерно распределяют в среде, после чего пробирки охлаждают в проточной водопроводной воде до застывания агара. Посевы инкубируют в течение 18–24 ч при температуре 43°C . О наличии *C. perfringens* судят по росту черных колоний в пробирках со средой.

13.4. Определение количества термофильных микроорганизмов в почве

Для определения индекса термофильных бактерий в стерильные чашки Петри вносят по 1 см^3 разведений почвенной суспензии от 10^{-1} до 10^{-3} , заливают их расплавленным и охлажденным до 45°C МПА. После застывания агара чашки инкубируют в течение 24 ч при температуре 60°C , после чего подсчитывают число выросших колоний и определяют количество термофильных бактерий в 1 г почвы с учетом разведения.

13.5. Обнаружение в почве палочек протей

Бактерии рода *Proteus* попадают из почвы на пищевые продукты и при благоприятных условиях размножаются в них. Продукты жизнедеятельности палочек протей могут вызвать пищевое отравление.

Для обнаружения в почве палочек протей по методу Шукевича в конденсационную воду свежескошенного МПА вносят 0,1 см³ соответствующего разведения почвенной суспензии. Пробирки выдерживают в течение 24–48 ч в термостате при температуре 37 °С, после чего регистрируют рост протеев по образованию тонкой вуалевидной пленки на скошенной поверхности агара. При наличии такой пленки готовят микроскопический препарат с ее поверхности, окрашивают его по Граму, определяют подвижность и способность образовывать H₂S.

Результаты санитарно-микробиологического исследования почвы анализируют и дают ей оценку, пользуясь данными, приведенными в табл. 13.1.

Таблица 13.1

**Схема оценки санитарного состояния почвы
по микробиологическим показателям**

Категории почв	Титр (г)			Индекс термо- фильных мик- роорганизмов, КОЕ/г
	БГКП	нитрифици- рующих бак- терий	перфрингенс	
Чистая	1,0 и выше	0,1 и выше	0,01 и выше	10 ² –10 ³
Загрязненная	0,9–0,01 и ниже	0,09–0,0001	0,009–0,0001	10 ³ –10 ⁵
Сильно за- грязненная	0,009 и ниже	0,00009 и ниже	0,00009 и ниже	10 ⁵ –4·10 ⁶

Контрольные вопросы

1. В каких слоях почвы меньше всего микроорганизмов?
2. Какие группы микроорганизмов определяют в почве?
3. Возбудители каких инфекционных заболеваний могут встречаться в почве?
4. Как осуществляют взятие пробы почвы и ее подготовку к анализу?
5. Что такое колититр и колииндекс почвы?

14. ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ПОРЧУ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Цель работы: ознакомиться с морфологическими и физиологическими признаками бактерий, наиболее часто размножающихся на пищевых продуктах и вызывающих их порчу.

14.1. Род *Micrococcus*

Представители рода *Micrococcus* имеют клетки сферической формы диаметром 0,5–2,0 мкм, располагающиеся поодиночке или в неправильных скоплениях. У некоторых видов микрококков наблюдается тенденция к соединению клеток в тетрады. Микрококки грамположительны, неподвижны, спор не образуют.

Облигатные аэробы. Каталазоположительны.

Многие представители этого рода образуют пигменты, в результате чего колонии окрашены в белый, желтый, оранжевый, розовый, золотистый цвет.

Род *Micrococcus luteus* (рис. 14.1). Клетки крупные, диаметром до 1,5 мкм, располагаются одиночно. На плотной среде образует круглые выпуклые колонии правильной формы с блестящей поверхностью желтого цвета.

Micrococcus roseus. Клетки мелкие диаметром около 0,6 мкм. На плотной среде образует круглые блестящие колонии небольшого размера с ровными краями, окрашенные в розовый цвет.

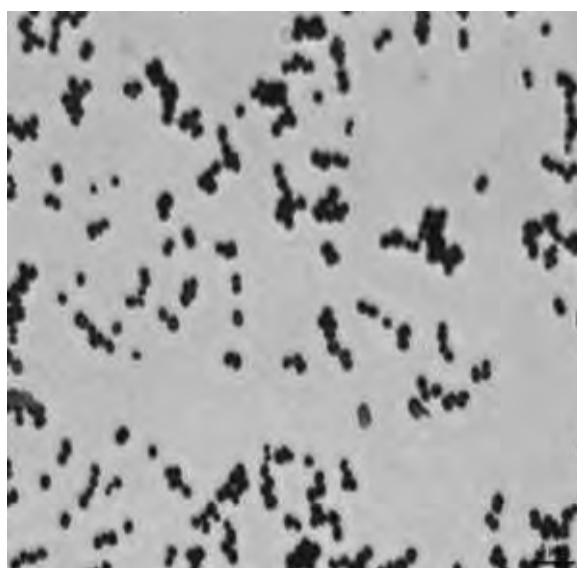


Рис. 14.1. *Micrococcus luteus*

Оптимальная температура роста микрококков от 25 до 30 °С. Отдельные виды могут выдерживать нагревание до 63–65 °С в течение 30 мин и кратковременную пастеризацию при температуре 72–75 °С.

Микрококки часто встречаются в воздухе, откуда попадают в пищевые продукты. Интенсивное размножение микрококков в молоке приводит к появлению в нем горького вкуса и свертыванию при низкой кислотности (40–60 °Т), что обусловлено их способностью выделять фермент типа сычужного. В сгущенном молоке с сахаром наряду с появлением горького вкуса образуются хлопья или происходит его загустевание. При размножении на поверхности пищевых продуктов микрококки образуют окрашенные в разные цвета пигментные пятна.

14.2. Род *Enterococcus*

По современной систематике, род *Enterococcus* входит в семейство *Enterococcaceae*, порядок *Lactobacillales*. Энтерококками называют стрептококки кишечного происхождения, они являются представителями нормальной микрофлоры кишечника человека и животных. В настоящее время энтерококки, как и кишечные палочки, считаются санитарно-показательными микроорганизмами.

Клетки энтерококков сферические или овальные диаметром от 0,6 до 2,5 мкм, располагаются попарно или цепочками (рис. 14.2). Грамположительные, неподвижные, спор и капсул не образуют.



Рис. 14.2. *Enterococcus faecalis*

По отношению к кислороду воздуха энтерококки являются факультативными анаэробами. На поверхности плотных питательных сред образуют мелкие выпуклые бесцветные колонии, глубинные колонии напоминают лодочку. Типичными представителями рода являются *Enterococcus faecalis*, *E. faecies*.

Энтерококки осуществляют метаболизм бродильного типа, сбраживают углеводы с образованием, в основном, молочной кислоты. Оптимальная температура роста энтерококков 30–37 °С, температурный диапазон роста от 10 до 45 °С. Энтерококки довольно устойчивы к воздействию факторов внешней среды, выдерживают кратковременное нагревание до температуры 75–80 °С, могут расти в среде, содержащей 6,5 % хлорида натрия, и в щелочной среде с pH 9,6. Энтерококки расщепляют белки с образованием горьких пептидов, что приводит к появлению горечи в пищевых продуктах.

14.3. Род *Sarcina*

Род *Sarcina* включен в семейство *Peptococcaceae*. Клетки почти сферические, диаметром 1,5–3,0 мкм, собранные в пакеты (кубы) по восемь или более кокков, поскольку деление клеток происходит в трех взаимно перпендикулярных плоскостях (рис.14.3).

Грамположительные, неподвижные, не образующие эндоспор. Исключение составляет вид *Sporosarcina urea*, имеющий жгутики и образующий споры.

Тип питания – хемоорганотрофы. Типовой вид – *Sarcina ventriculi*.



Рис. 14.3. *Sarcina ventriculi*

На поверхности плотной среды в чашках Петри сарцины образуют округлые, выпуклые колонии средних размеров с ровными краями, гладкие или бугристые, зернистой структуры, желтого, лимонно-желтого, иногда розового или белого цвета. Вызывают пигментацию пищевых продуктов.

14.4. Род *Staphylococcus*

Стафилококки встречаются в основном на кожных покровах и слизистых оболочках теплокровных животных, но часто могут быть выделены из воздуха, пищевых продуктов. Некоторые виды способны вызывать оппортунистические инфекции у человека и животных.

Клетки бактерий рода *Staphylococcus* имеют сферическую форму диаметром 0,5–1,5 мкм, встречаются поодиночке или парами, а также образуют характерные неправильные скопления, напоминающие виноградную гроздь, что является результатом деления клеток в трех взаимно перпендикулярных плоскостях (рис.14.4).

Стафилококки грамположительны, неподвижны, спор и капсул не образуют.

Факультативные анаэробы. Это хемоорганотрофы, обладающие дыхательным и бродильным типами метаболизма.

На плотной среде стафилококки образуют круглые, выпуклые, блестящие колонии белого, желтого или золотистого цвета. Основными представителями рода являются *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. aureus* (золотистый стафилококк).

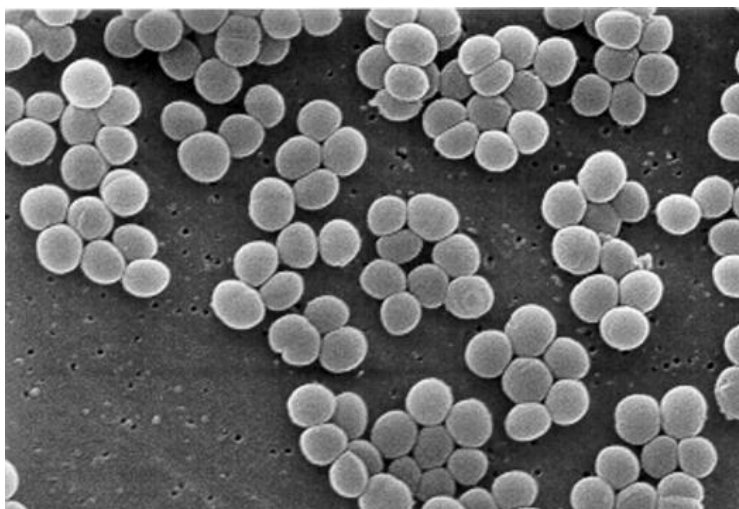


Рис. 14.4. *Staphylococcus aureus*

Оптимальная температура роста стафилококков 30–37 °С. Представители этого рода устойчивы к повышенной температуре, которая применяется при тепловой обработке пищи. Размножение золотистого стафилококка в пищевых продуктах вызывает в них накопление экзотоксина, являющегося причиной пищевых отравлений.

14.5. Род *Escherichia*

Род *Escherichia* относится к семейству *Enterobacteriaceae*. Типичные представители этого рода – мелкие грамотрицательные палочки с закругленными концами размером $(0,5–0,7) \times (2,0–3,0)$ мкм. В мазках располагаются беспорядочно. Подвижные в жидких средах за счет перитрихально расположенных жгутиков. У большинства клеток обнаруживаются пили. Спор, цист и капсул не образуют. Типовой вид *Escherichia coli*.

Escherichia coli – кишечная палочка (рис. 14.5) – факультативный анаэроб, хорошо растет на простых питательных средах при оптимальной температуре 37 °С. Колонии на мясопептонном агаре гладкие, блестящие, с ровными краями, слабовыпуклые, сероватые.

Размножение кишечных палочек в пищевых продуктах приводит к развитию таких пороков, как нечистый вкус, вспучивание.

Присутствие кишечной палочки в пищевых продуктах является показателем нарушения санитарного режима на производстве.

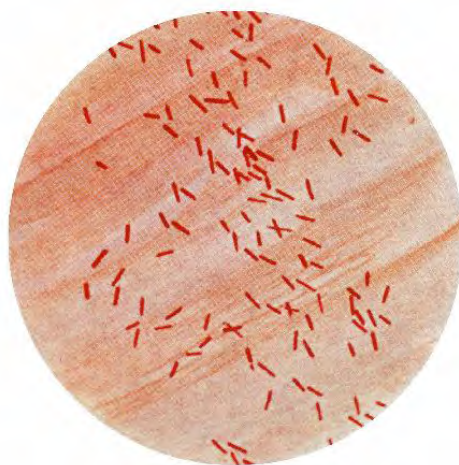


Рис. 14.5. *Escherichia coli*

14.6. Род *Proteus*

Род *Proteus* относится к семейству *Enterobacteriaceae*. Представители рода часто встречаются в кишечнике человека, животных, в навозе, почве и загрязненных водах. Протеи легко идентифицировать благодаря их способности к роению. Роение протеев приводит к образованию вуалевидного налета на поверхности плотной питательной среды. Типовой вид – *Proteus vulgaris*.

Proteus vulgaris (палочка протей). Клетки протеев – мелкие грамтрицательные палочки размером $(0,4-0,6) \times (1,0-3,0)$ мкм. Не образуют эндоспор и капсул. Очень подвижны – перитрихи (рис. 14.6).

Факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы, обладающие дыхательным и бродильным типами метаболизма. Оптимальная температура роста 37 °С.

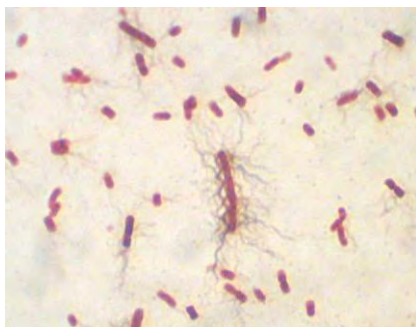


Рис. 14.6. *Proteus vulgaris*

Палочка протей обладает активными протеазами и вызывает гнилостную порчу мяса и мясных изделий, рыбы, молочных продуктов. При разложении белков образует сероводород, аммиак и индол. Размножение протеев в продуктах может привести к пищевому отравлению.

14.7. Род *Pseudomonas*

Род *Pseudomonas* относится к семейству *Pseudomonadaceae*. Псевдомонады широко распространены в природе. Их обнаруживают в почве, воде, пищевых продуктах. Клетки псевдомонад – мелкие грамтрицательные палочки размером $(0,5-1,0) \times (1,5-5,0)$ мкм, спор и капсул не образуют, подвижны за счет одного или нескольких полярно расположенных жгутиков.

Строгие аэробы. На плотных средах образуют круглые или неправильной формы колонии, плоские и выпуклые, слизистые, часто пигментированные. Метаболизм только дыхательного типа с использованием кислорода в качестве конечного акцептора электронов. Способны расти в диапазоне температур от 4 до 43 °С.

Pseudomonas fluorescens (флюоресцирующая палочка), образует на питательном агаре крупные слизистые колонии, окрашенные в желтый или желто-зеленый цвет, часто флюоресцирующие (рис. 14.7).



Рис.14.7. *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas aeruginosa (синегнойная палочка), выделяет в среду синий пигмент пиоцианин, поэтому ее колонии окрашены в синий цвет. Является условно-патогенным микроорганизмом.

Большинство псевдомонад являются психрофилами, способными размножаться при низких температурах хранения пищевых продуктов (от 2 до 4 °С).

Псевдомонады обладают активными протеолитическими и липолитическими ферментами, вызывая распад белков и жиров, что приводит к быстрой порче мясных, молочных и рыбных продуктов.

14.8. Род *Bacillus*

Род *Bacillus* относится к семейству *Bacillaceae*. Бактерии этого рода представляют собой палочки разной длины и толщины, грамположительные, в большинстве подвижные, образующие эндоспоры.

Аэробы или факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы, метаболизм дыхательного или бродильного типа.

Bacillus subtilis (сенная палочка) – тонкие, короткие, грамположительные палочки размером $(0,5-2,5) \times (3,0-5,0)$ мкм, располагающиеся одиночно или цепочками. Клетки подвижные за счет перитрихально расположенных жгутиков. Споры овальные, размером от 0,6 до 0,9 мкм, занимают центральное положение внутри клетки (рис. 14.8, а).

На мясопептонном агаре ***B. subtilis*** образует сухие морщинистые или бархатистые плоские колонии с волнистым краем, бесцветные или розоватые.

Споры сенной палочки весьма термоустойчивы, выдерживают кратковременную стерилизацию. Оптимальная температура роста 25–37 °С. Сенная палочка относится к гнилостным бактериям, она обладает активными протеазами, разлагающими белки молока, мяса, а также амилазами, вызывающими «картофельную болезнь» хлеба.

Bacillus megaterium (земляная палочка, от лат. *terra* – земля) – крупные зернистые палочки с закругленными концами размером $(5-7) \times (1,2-1,5)$ мкм, располагающиеся длинными цепочками. Споры эллиптические, располагающиеся в центре клетки (рис. 14.8, б).

На плотной питательной среде образует крупные, гладкие, матовые или блестящие колонии с волнисто-бахромчатыми краями, серовато-белые. Обладает активными протеазами, расщепляет углеводы с образованием кислоты.

Bacillus mycoides (грибовидная палочка) – мелкие палочки размером $(5-7) \times (0,8-1,2)$ мкм, в цитоплазме имеются вакуоли и гранулы запасных питательных веществ. Споры овальной формы (рис. 14.8, в).

На питательном агаре образует колонии, напоминающие рост гриба: ризоидные или мицелиевидные, стелющиеся по поверхности агара.

Грибовидная палочка обладает активными протеазами, разлагает белки с образованием горьких пептидов.

Bacillus cereus (от лат. *cera* – восковой) – короткие толстые клетки размером $(3-5) \times (1,0-1,5)$ мкм, одиночные или соединенные в цепочки. Споры овальные $(1,5 \times 0,9)$ мкм, располагаются субтерминально (смещены от центра к концу клетки).

Колонии на питательном агаре восковидные, толстые, матовые со складчатым центром и ризоидными волнистыми краями, иногда

мелкобугристые с бахромчатыми краями, от которых отходят тонкие сплетения нитей.

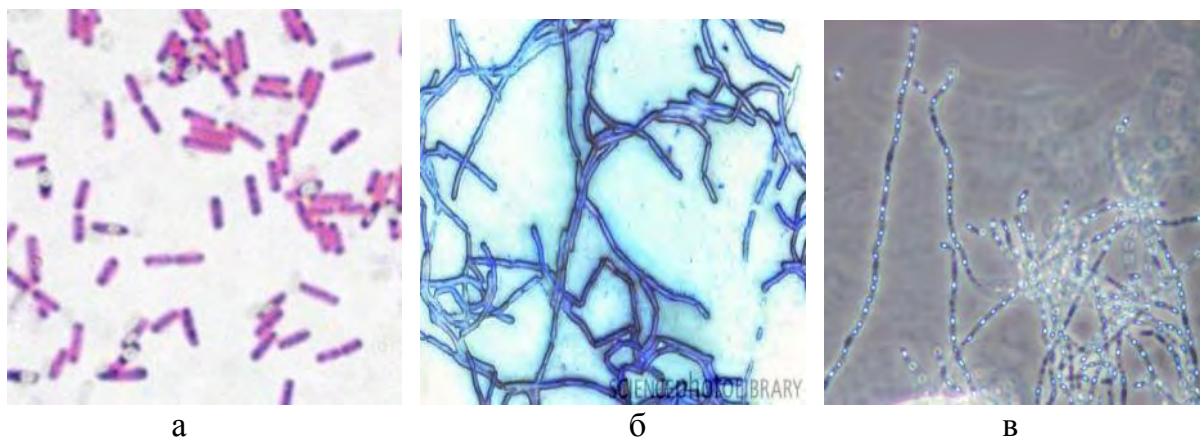


Рис. 14.8. Род *Bacillus*:
а – *Bacillus subtilis*; б – *Bacillus megaterium*; в – *Bacillus mycoides*

B. cereus является потенциально опасным микробом, так как контаминированные им пищевые продукты могут вызвать отравление.

14.9. Род *Clostridium*

Род *Clostridium* входит в семейство *Clostridiaceae*. Палочковидные бактерии, грамположительные, в молодом возрасте, как правило, подвижные (перитрихи). Образуют эндоспores, которые обычно превышают диаметр клетки.

Строгие анаэробы. Одни представители клостридий являются сахаролитическими, которые расщепляют сахара при маслянокислом и ацетоно-бутиловом брожении; другие – протеолитическими, вызывающими гнилостные процессы. Некоторые клостридии способны провоцировать пищевые отравления: ботулизм – возбудитель *Clostridium botulinum*, токсикоинфекции – возбудитель *Clostridium perfringens*. Среди клостридий встречаются и патогенные для человека виды, являющиеся возбудителями газовой гангрены (*Clostridium septicum*, *C. perfringens*, *C. novyi*), столбняка (*Clostridium tetani*).

Clostridium butyricum – маслянокислые бактерии. Крупные палочки размером $(0,5-1,5) \times (5-12)$ мкм, грамположительные, подвижные до момента спорообразования. Споры располагаются терминаль-

но или субтерминально. Клетки со спорами имеют вид булавы, теннисной ракетки или ложки.

Маслянокислые бактерии относятся к группе сахаролитических клостридий; они сбраживают углеводы с образованием масляной, уксусной, муравьиной кислот и большого количества газов, в связи с чем вызывают такие пороки пищевых продуктов, как прогорклый вкус, бомбаж консервов, вспучивание сыров.

Clostridium perfringens – крупная палочка размером $(1-2) \times (5-8)$ мкм, в отличие от других клостридий неподвижная, в организме человека и животных образует капсулу. Споры располагаются терминально или субтерминально (рис. 14.9).

Хемоорганотрофы, метаболизм бродильного типа.

На плотной среде бактерии образуют мелкие круглые колонии с гладким или зубчатым краем. При росте на кровяном агаре колонии палочки перфрингенс круглые, гладкие, сероватые, впоследствии приобретающие зеленую окраску и окруженные зоной β -гемолиза.

Бактерии этого вида синтезируют ряд ферментов агрессивно-сти: лецитиназу, коллагеназу, гиалуронидазу и др.

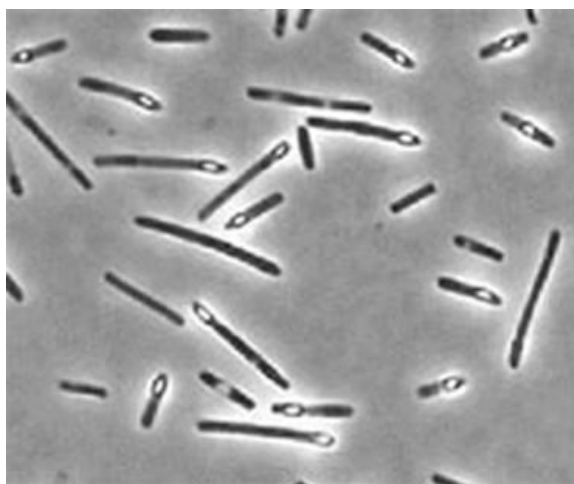


Рис. 14.9. *Clostridium perfringens*

Палочка перфрингенс относится к сахаролитическим клостридиям. Этот вид вызывает быстрое свертывание молока с образованием губчатого сгустка. Споры термоустойчивы, способны выдержать кипячение в течение 2 ч. Обладает сульфитредуцирующей способностью. Некоторые серологические варианты этого вида (А и С) образуют эндотоксины, поэтому способны вызвать пищевые токсикоинфекции.

Clostridium putrificum – крупная грамположительная палочка, имеющая овальные споры, располагающиеся на конце клетки. Микроб относится к группе протеолитических бактерий, разлагает белки с образованием сероводорода и аммиака. Вызывает порок «гниющий сыр».

Clostridium sporogenes – подвижная палочка длиной 3–4 мкм и диаметром 0,9 мкм с закругленными концами. Крупные овальные споры располагаются в центре клетки. Характерным является быстрое образование спор (в течение первых суток роста). Сбраживает углеводы с образованием кислоты и газа. При разложении белков наблюдается обильное выделение сероводорода. Оптимальная температура роста от 35 до 40 °С, минимальная 8 °С. Является возбудителем порчи баночных мясных, рыбных, овощных консервов.

Clostridium botulinum – крупные палочки размером (3,4–8,6)×(1,0–1,3) мкм, грамположительные, подвижные до момента спорообразования, капсул не образуют. Споры располагаются терминально. Клетки со спорами имеют вид теннисной ракетки, лодочки, ложки (рис. 14.10).

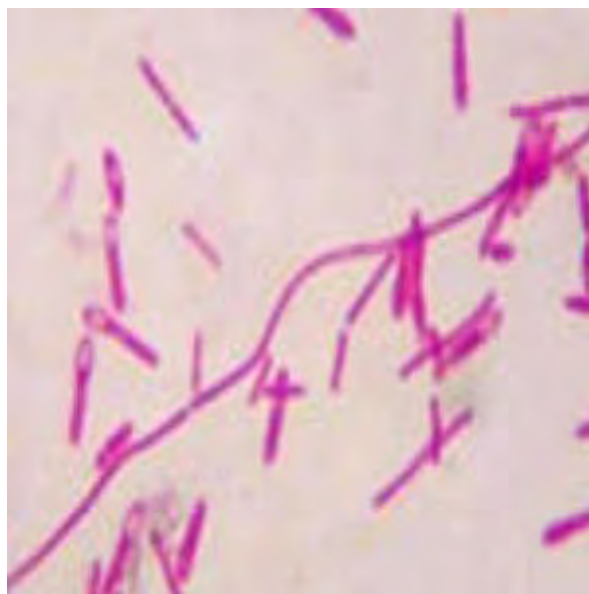


Рис. 14.10. *Clostridium botulinum*

C. botulinum образует два экзотоксина: нейротоксин и гемолизин. Накопление в пищевых продуктах нейротоксина приводит к тяжелому пищевому отравлению, часто с летальным исходом.

Контрольные вопросы

1. Какие виды порчи пищевых продуктов вызывают бактерии, обладающие высокой протеолитической активностью?
2. Какие из описанных бактерий вызывают пищевые отравления?
3. Как относятся к кислороду воздуха бациллы и клостридии?
4. Перечислите роды бактерий, образующие и не образующие эндоспоры.
5. Какие из указанных родов относятся к семейству *Enterobacteriaceae*?

15. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

15.1. Определение количества мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ)

Микробиологическое исследование пищевых продуктов проводят с целью выявления КМАФАнМ путем высева на чашки Петри с питательной средой (мясопептонным агаром) или отдельных групп микроорганизмов путем высева на элективные питательные среды. Количество микроорганизмов определяют в 1 см³ продукта жидкой консистенции или в 1 г продукта плотной консистенции.

Отбор средней пробы. При анализе партии продукта готовят среднюю пробу. Для разных пищевых продуктов установлены нормы отбираемых средних проб и правила их отбора. Однако во всех случаях необходимо соблюдать условия, исключаящие контаминацию исследуемого продукта посторонними микроорганизмами.

При исследовании жидкие и полужидкие продукты (молоко, сметана, соусы и др.) тщательно перемешивают и затем отбирают в стерильную посуду простерилизованным черпаком емкостью 50–100 см³. Пробы плотных продуктов (мясо, колбаса, рыба, кулинарные изделия и др.) отбирают из толщи продукта в разных местах. Предварительно поверхность исследуемых участков прижигают раскаленным ножом и по ней делают глубокий разрез стерильным скальпелем. Край разреза раздвигают стерильным пинцетом и вырезают стерильными ножницами небольшие кусочки продукта. Отобранные таким образом из разных мест образцы измельчают, собирают в стерильную тару и составляют из них среднюю пробу.

При оборе средней пробы таких продуктов, как сливочное масло, творог, сыр используют стерильный щуп, который вводят в продукт с одного края и доводят до противоположного вглубь и наискосок. Затем стерильным скальпелем из нескольких мест отобранной пробы берут кусочки, измельчают их и помещают в стерильную посуду.

Подготовка пробы к анализу. При исследовании плотных продуктов из средней пробы берут навеску массой от 1 до 10 г, переносят ее в стерильную ступку и тщательно растирают. Если продукт очень плотный, то его растирают в ступке с предварительно прогретым кварцевым песком. Растертый продукт вносят в колбу, содержа-

щую от 90 до 99 см³ стерильного физиологического раствора (0,5 %-й раствор хлорида натрия). Содержимое колбы осторожно взбалтывают в течение 5 мин. В колбе получается первое разведение продукта (1:10), из которого готовят последующие разведения.

Навеску сливочного масла расплавляют на водяной бане при температуре не выше 45 °С, после чего в 9 см³ физиологического раствора вносят стерильной пипеткой 1 см³ продукта, получая разведение 1:10.

Для исследования жидких и полужидких продуктов из полученной средней пробы после тщательного перемешивания отбирают стерильной пипеткой 1 см³ продукта и вносят его в пробирку, содержащую 9 см³ стерильного физиологического раствора.

Приготовление разведений. Пищевые продукты могут содержать значительное количество микроорганизмов, поэтому, чтобы получить изолированные колонии, необходимо приготовить десятикратные разведения продукта.

Полученное 1-е разведение продукта тщательно перемешивают новой стерильной пипеткой, вбирая в нее и выпуская из нее полученную взвесь. Эту процедуру выполняют 3–5 раз, затем той же пипеткой отбирают 1 см³ суспензии и переносят её во 2-ю пробирку с 9 см³ стерильного физиологического раствора. Получают 2-е разведение (1:100). Пипетку нельзя погружать в жидкость во избежание смывания микроорганизмов с ее наружной поверхности. Новой стерильной пипеткой тщательно перемешивают содержимое 2-го разведения, набирают из него 1 см³ и переносят в следующую пробирку с 9 см³ стерильной воды, получая третье разведение (1:1000). Таким же образом готовят последующие разведения до получения необходимого результата.

В н и м а н и е ! Для приготовления каждого разведения следует использовать отдельную стерильную пипетку. Пренебрежение этим правилом может привести к получению ошибочного результата.

Посев в чашки Петри. Для определения КМАФАнМ используют метод глубинного посева на плотные питательные среды. Схема посева приведена на рис. 15.1. На крышках чашек стеклографом отмечают исследуемый вариант и разведение. Каждое разведение высевают не менее чем в 2–3 параллельные чашки. Разведения выбирают с таким расчетом, чтобы на чашке выросло от 30 до 300 колоний. Стерильной пипеткой отбирают из пробирки по 1 см³ соответствующего разведения суспензии и переносят его в 2–3 пустые стерильные чашки Петри. После внесения разведения суспензии чашки заливают питательной средой не позднее чем через 15 мин. Для этого над пла-

менем спиртовки вынимают пробку из пробирки или колбы с расплавленной и остуженной до 45–50 °С питательной средой и обжигают края. Затем приоткрывают крышку чашки так, чтобы только вошло горлышко колбы, и осторожно вливают 10–15 см³ питательного агара, толщина слоя которого должна быть около 5 мм. Чашку закрывают крышкой и сразу же легкими вращательными движениями перемешивают питательную среду с посевным материалом, после чего оставляют на 10–15 мин в горизонтальном положении для застывания среды. Засеянные чашки переворачивают вверх дном и помещают на 24–48 ч в термостат с температурой 37±1 °С.

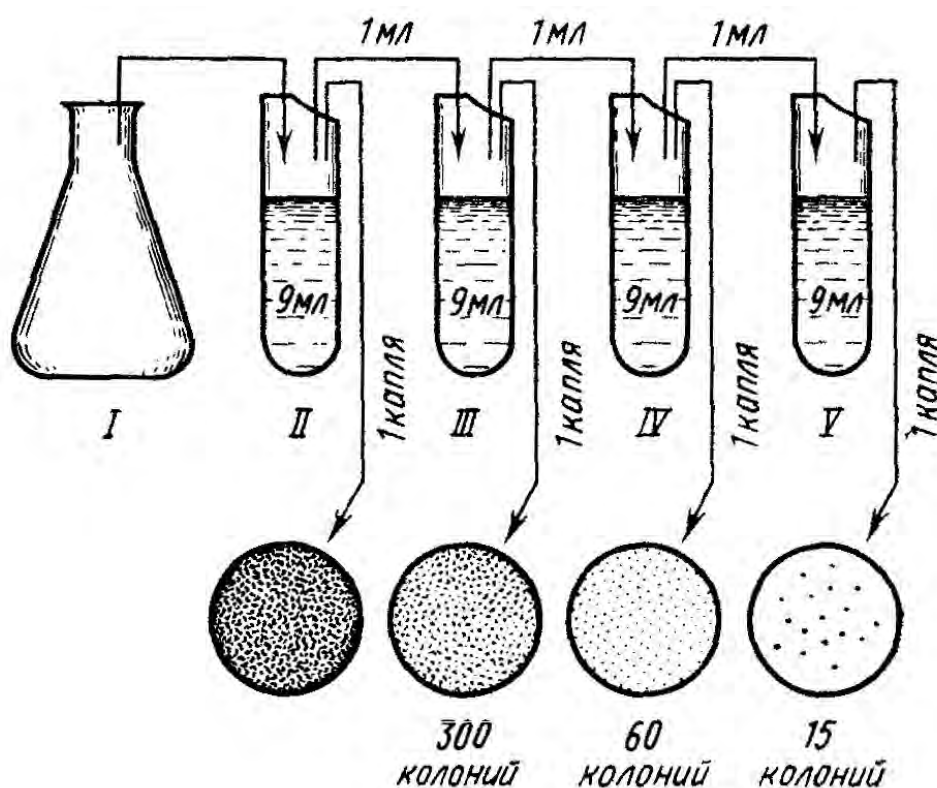


Рис. 15.1. Схема посева продукта для определения КМАФАнМ

Подсчет выросших колоний. После инкубации отбирают чашки, на которых выросло от 30 до 300 колоний, подсчитывают их визуально или с помощью специального прибора для подсчета колоний. При подсчете колоний чашки просматривают в проходящем свете и отмечают подсчитанные колонии чернилами или тушью. В случае, если на чашке с максимальным разведением выросло более 300 коло-

ний, можно вести их подсчет при помощи лупы и сетки из оргстекла со стороной квадрата 1 см при боковом освещении. Подсчет колоний проводят не менее чем в 20 квадратах, определяют среднее их число на 1 см² и умножают на площадь поверхности среды в чашке.

Количество микроорганизмов в 1 см³ (или в 1 г) продукта (КМАФАнМ) определяют как произведение количества выросших колоний (N) на показатель разведения (n):

$$\text{КМАФАнМ} = N \cdot 10^n \text{ КОЕ/см}^3.$$

Примечание. Анаэробные микроорганизмы не определяются чашечным методом, так как для их выращивания необходимо создать анаэробные условия. Культивирование анаэробов осуществляют в анаэростатах (см. рис. 4.1) или используют питательные среды с редуцирующими веществами.

15.2. Определение бактерий группы кишечных палочек (БГКП) в пищевых продуктах

Определение БГКП в пищевых продуктах проводят в соответствии с ГОСТ Р 50474–93. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечной палочки (колиформных бактерий).

Метод определения БГКП основан на обнаружении образования газа и кислоты при высеве определенного количества продукта (или смыва с его поверхности) в жидкие питательные среды, содержащие лактозу (среда Кесслера) с последующим подтверждением принадлежности выросших микроорганизмов к группе кишечных палочек по морфологическим и культуральным признакам.

Исследование на наличие БГКП проводят в несколько этапов:

І э т а п – приготовление разведений продукта. Если продукт плотный (колбаса, сыр, масло, творог и др.), то результат выражают в отсутствии БГКП в определенной его массе (г). Если продукт жидкий (молоко, кисломолочные напитки, сок и т.д.), то БГКП должны отсутствовать в определенном его объеме (см³ или дм³).

ІІ э т а п – посев определенного количества продукта или его разведений в среду Кесслера. Среду Кесслера разливают в пробирки или колбы, в которые помещают поплавки (стеклянная трубочка

с одним запаянным концом). После стерилизации поплавков должен быть заполнен средой.

В пробирки со средой Кесслера вносят по 1 см³ соответствующего разведения продукта (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3}) и ставят в термостат при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Через 24 ч инкубации посеvy просматривают и отмечают образование газа в поплавке и изменение цвета среды из фиолетового в желто-зеленый. Записывают, в каких разведениях произошло газообразование.

Ш э т а п – подтверждение принадлежности микроорганизмов, выросших на среде Кесслера, к БГКП. Из забродивших пробирок со средой Кесслера делают пересев петлей на поверхность плотной среды Эндо таким образом, чтобы получить изолированные колонии. Для этого дно чашки Петри расчерчивают карандашом по стеклу на 4–8 секторов. Из каждой пробирки делают посев на отдельный сектор. Бактериологической петлей из пробирки берут минимальное количество исследуемого материала и высевают его в секторе зигзагообразным штрихом, не отрывая петлю от поверхности агара и не нарушая его целостности. Чашки Петри подписывают и помещают на 18–24 ч в термостат (крышками вверх) с температурой $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

После инкубации чашки просматривают. Бактерии группы кишечной палочки образуют на среде Эндо красные или розовые блестящие колонии с металлическим блеском или без него. Такой характер роста на среде Эндо эти бактерии дают за счет сбраживания лактозы и образования кислоты, вызывающей восстановление индикатора фуксина, окрашивающего колонии в красный цвет.

Из типичных колоний на среде Эндо готовят препараты, окрашивают их по Граму и микроскопируют. Если в препарате обнаруживаются мелкие граммотрицательные неспорообразующие палочки, то одновременно ставят оксидазный тест. Заключение о том, что обнаруженные в продукте микроорганизмы относятся к БГКП, делают на основании выявления в посевах граммотрицательных, не образующих спор палочек, сбраживающих лактозу с образованием кислоты и газа при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ с отрицательным тестом на оксидазу. При этом указывают массу навески продукта (в г) или его объем (в см³). В случае отсутствия на среде Эндо типичных для БГКП колоний продукт считают не загрязненным кишечными палочками.

15.3. Определение количества дрожжей и плесеней

Для определения количества дрожжей и плесеней в пищевых продуктах делают посев соответствующих разведений в чашки Петри, которые заливают расплавленным и остуженным до температуры 45–50 °С сусло-агаром (СА) или средой Сабуро. Содержимое чашек перемешивают вращательными движениями и оставляют для застывания на 10–15 мин, после чего ставят в термостат с температурой 30±2 °С на 2–3 сут. После инкубации в чашках подсчитывают отдельно количество выросших колоний плесеней и дрожжей. Результат выражают числом КОЕ/ см³ (или г).

Контрольные вопросы

1. Что такое КМАФАнМ?
2. Для чего делают разведения пищевого продукта при определении количества микроорганизмов?
3. Какие питательные среды используют для определения КМАФАнМ, дрожжей и плесеней?
4. Из каких этапов состоит определение БГКП в пищевых продуктах?
5. Какие среды используют для определения БГКП в пищевых продуктах?
6. По каким признакам устанавливают рост БГКП в среде Кесслера?
7. Как выглядят колонии БГКП на среде Эндо?
8. В каком случае дают положительный ответ на присутствие в пищевом продукте БГКП?

ПРИЛОЖЕНИЕ

Питательные среды и реактивы, используемые в микробиологической практике

Основой большинства питательных сред являются мясная вода, для дрожжей – пивное сусло, для требовательных к питанию молочнокислых бактерий – гидролизованное молоко, для некоторых – печеночный отвар, перевар Хоттингера и др.

1. Среда для культивирования мезофильных и термофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

1.1. Мясопептонный бульон (МПБ). Для приготовления МПБ готовят сначала *мясную воду*. С этой целью говяжье мясо, освобожденное от костей, жира, сухожилий, режут на мелкие кусочки или пропускают через мясорубку. Измельченное мясо заливают холодной водой из расчета 1 дм³ на 500 г мяса и оставляют на 12–18 ч в холодильнике. На следующий день смесь медленно нагревают на огне и кипятят в течение 15–20 мин, периодически помешивая. Остывшую массу фильтруют через ватно-марлевый фильтр и доливают воду до первоначального объема. К полученной мясной воде добавляют 1 % пептона, 0,5 % хлорида натрия, до требуемого значения устанавливают рН путем добавления насыщенного раствора натрия гидрокарбоната или 10 %-го раствора натрия гидроксида. Стерилизуют при температуре 121±1 °С в течение 15–20 мин.

1.2. Мясопептонный агар (МПА). К 1 дм³ МПБ перед стерилизацией добавляют 20 г агара и нагревают на слабом огне до полного растворения агара. Горячий МПА фильтруют через ватно-марлевый фильтр, устанавливают рН в пределах 7,2–7,4, разливают в колбы или пробирки и стерилизуют при температуре 121±1 °С в течение 20 мин.

МПА можно приготовить из сухого питательного агара, выпускаемого предприятиями микробиологической промышленности. Для этого 50 г порошка сухого питательного агара переносят в закрытый сосуд с 1 дм³ холодной водопроводной воды и кипятят на слабом огне

до полного растворения агара в течение 1–2 мин при помешивании. Устанавливают рН среды 7,0–7,2, раствор фильтруют через вату и стерилизуют при температуре 121 ± 1 °С в течение 20 мин.

1.3. Мясопептонный бульон (агар) с глюкозой и дрожжевым экстрактом. К 1 дм³ мясопептонного бульона (агара) перед стерилизацией добавляют 10 г глюкозы и 2 г дрожжевого экстракта (или 10 см³ его раствора). Устанавливают рН среды 7,0–7,2 и стерилизуют при температуре 121 ± 1 °С в течение 20 мин.

1.4. Дрожжевой экстракт. 100 г прессованных хлебопекарных дрожжей измельчают и заливают 500 см³ прокипяченной и остуженной до 60 °С водопроводной воды. Смесь помещают в термостат при температуре 58–60 °С на 72 ч и ежедневно встряхивают 1–2 раза. При этом происходит автолиз дрожжевых клеток, ферменты клеток гидролизуют сложные вещества и дрожжевая масса разжижается. Дрожжевой экстракт фильтруют, разливают небольшими порциями и стерилизуют при 121 ± 1 °С в течение 15 мин. Готовый к употреблению экстракт лучше хранить в холодильнике.

2. Среда для культивирования дрожжей и плесневых грибов

Для выявления и количественного учета дрожжей и плесневых грибов в пищевых продуктах используют питательные среды, селективность которых достигается низким значением рН и введением антибиотиков широкого спектра действия (тетрациклин, левомицетин, неомицин и др.) для подавления сопутствующей бактериальной флоры.

2.1. Среда Сабуро. К 1 дм³ дистиллированной воды добавляют 18 г агара и оставляют на 30 мин для его набухания, затем добавляют 40 г глюкозы и 10 г пептона. Смесь подогревают на слабом огне до полного расплавления агара. Расплавленную среду фильтруют через ватно-марлевый фильтр и устанавливают рН таким образом, чтобы после стерилизации он составлял 6,5–6,6. Разливают в колбы и стерилизуют в течение 15 мин при температуре 121 ± 1 °С.

Среду Сабуро используют как основу для приготовления сред с антибиотиками. Допускается применение среды без антибиотиков при анализе консервированных продуктов на промышленную стерильность.

2.2. Сусло пивное неохмеленное. Готовое неохмеленное пивное сусло разбавляют водой до массовой доли сухих веществ 7–8 %, разливают в колбы или пробирки и стерилизуют в течение 20 мин при температуре 116 ± 1 °С.

2.3. Сусло-агар. К 1 дм³ разбавленного пивного сусла прибавляют 20 г агара. Среду расплавляют на водяной бане и фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Фильтрат разливают по колбам или пробиркам и стерилизуют в течение 15 мин при температуре 116 °С.

3. Среды для культивирования бактерий группы кишечной палочки

3.1. Среда Эндо. 100 см³ мясопептонного агара (рН 7,4) расплавляют и охлаждают до температуры 70 °С. Прибавляют 1 г лактозы (х.ч.), предварительно растворенной в стерильной пробирке с небольшим количеством дистиллированной кипяченой воды.

В отдельных пробирках готовят 2–3 см³ спиртового насыщенного раствора основного фуксина, 10 см³ 10 %-го водного раствора натрия сульфита.

В стерильную пробирку отмеривают 1 см³ фуксина и добавляют раствор натрия сульфита до обесцвечивания фуксина (бледно-розовый цвет). Приготовленную смесь вливают в расплавленный агар, хорошо перемешивают и разливают по чашкам. Горячий агар бледно-розового цвета при застывании становится бесцветным.

Среда Эндо выпускается отечественной микробиологической промышленностью в виде сухого порошка. Среду готовят в день ее использования согласно прописи на этикетке.

3.2. Глюкозопептонная среда Эйкмана. В 100 см³ воды растворяют 10 г пептона, 5 г хлорида натрия, нагревают смесь до кипения, фильтруют, прибавляют 10 г глюкозы, устанавливают рН 7,4–7,6,

разливают в пробирки или флаконы с поплавками и стерилизуют при 0,05 МПа в течение 20 мин.

3.3. Среда Кесслера. К 1 дм³ воды добавляют 10 г пептона, 50 см³ свежей бычьей желчи. Смесь кипятят при помешивании до полного растворения пептона, фильтруют через вату, растворяют 2,5 г лактозы, доводят объем до 1 дм³ и устанавливают реакцию среды (рН 7,4–7,6). Затем добавляют 2 см³ генцианвиолета, разливают в пробирки или колбы с поплавками и стерилизуют при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Среда Кесслера выпускается отечественной микробиологической промышленностью в виде сухого порошка. В лабораториях ее готовят согласно прописи, указанной на этикетке.

3.4. Среда Симмонса. Среда предназначена для определения способности энтеробактерий утилизировать цитраты.

Состав среды	г/дм ³
Аммония фосфат двузамещенный	1,6
Динатрия фосфат	1,1
Магния сульфат	0,2
Натрия цитрат	3,2
Натрия карбонат	0,05
Бромтимоловый синий водорастворимый	0,05
Натрия хлорид	6,0
Агар	9,0

Приготовление. Компоненты среды растворяют в дистиллированной воде, кипятят в течение 2–3 мин до полного расплавления агара. Значение рН среды 7,0–7,2. Среду разливают в пробирки по 4 см³ и стерилизуют при температуре 112 °С в течение 20 мин. Перед использованием агар расплавляют в пробирках на водяной бане и остужают их в наклонном виде. Цвет готовой среды оливково-зеленый.

Посев и интерпретация результатов. На цитратный агар Симмонса наносят минимальное количество посевного материала, свободного от среды, на которой выращивались микроорганизмы. Контрольную пробирку оставляют незасеянной. Посевы инкубируют при температуре 37 °С. Учет результатов проводят каждые 24 ч в течение 5 суток. Микроорганизмы, способные утилизировать цитраты, растут на среде Симмонса и изменяют ее цвет из зеленого в синий

(положительная реакция), а микроорганизмы, неспособные утилизировать цитраты, не растут на этой среде и не изменяют ее цвета (отрицательная реакция).

3.5. Агар Мак-Конки. Среда используется для идентификации бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Присутствующая в среде желчь, желчные соли и кристаллический фиолетовый подавляют рост сопутствующей микрофлоры.

Состав среды	г/л
Пептон	1,5
Панкреатический гидролизат желатина	17,0
Лактоза	10,0
Натрия хлорид	5,0
Соли желчных кислот	1,5
Кристаллический фиолетовый	0,001
Нейтральный красный	0,03
Агар	13,5

Приготовление. Ингредиенты растворяют в воде при кипячении в течение 1 мин с постоянным перемешиванием. Устанавливают рН среды $7,1 \pm 0,2$. Среду разливают в колбы, укупоривают их ватно-марлевыми пробками, сверху закрывают бумажными колпачками и стерилизуют при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Посев и интерпретация результатов. Посев производят штрихом для получения изолированных колоний. Чашки Петри инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 ч.

Колонии *Escherichia coli* – красные; *Klebsiella mobilis* – розовые; энтерококков – красные маленькие, круглые; стафилококков – светло-розовые, непрозрачные; *Pseudomonas aeruginosa* – зелено-коричневые, флюоресцирующие.

4. Среды для культивирования анаэробов

4.1. Среда Вильсона–Блера. Среда применяется для определения сульфитредуцирующей способности мезофильных анаэробных микроорганизмов, в частности для выявления *Clostridium perfringens* в пищевых продуктах.

Состав основы среды	см ³
Железоаммонийные квасцы – раствор концентрацией 50 дм ³	1
Натрия сульфит – раствор концентрацией 200 дм ³	10
Мясопептонный агар с содержанием глюкозы 10 дм ³	100

Приготовление. Растворы железоаммонийных квасцов и натрия сульфита готовят на стерильной дистиллированной воде. Раствор натрия сульфита стерилизуют текучим паром в течение 1 ч. К 10 мл расплавленного и охлажденного до температуры 80 °С МПА с глюкозой добавляют 10 мл раствора натрия сульфита и 1 мл раствора железоаммонийных квасцов. Устанавливают рН среды 7,5–7,8. Среду разливают по чашкам Петри.

Посев и интерпретация результатов. Посев инфицированного материала или высев из накопительной среды двухслойным методом. Инкубация в течение 18–24 ч в анаэробных условиях при температуре 37 °С. Сульфитредуцирующие клостридии формируют черные колонии вследствие образования сульфида железа.

5. Красители и реактивы для окраски бактерий по Граму

5.1. Феноловый раствор генциана фиолетового. Генциан фиолетовый – 1 г; этанол 96 %-й – 10 см³; фенол кристаллический – 2 г; вода дистиллированная – до 100 см³.

5.2. Раствор Люголя. Йодит калия – 2 г; йод кристаллический – 1 г; вода дистиллированная – до 300 см³. Вначале готовят концентрированный раствор йодита калия в 5 см³ воды, в нем растворяют йод, потом добавляют воду до 300 см³.

5.3. Фуксин Пфейфера. Водный раствор фуксина Циля: 1 см³ карболового фуксина Циля и 9 см³ дистиллированной воды.

5.4. Фуксин Циля. Для приготовления фуксина Циля 1 г основного фуксина растворяют в 10 см³ 96 %-го этанола, затем добавляют 5 г растворенного в воде фенола и несколько капель глицерина. Объем раствора дистиллированной водой доводят до 100 см³ и оставляют на несколько дней. Перед использованием его фильтруют.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Артемьева С.А. и др.** Микробиологический контроль мяса животных, птицы, яиц и продуктов их переработки: Справочник. – М.: КолосС, 2003. – 288 с.
2. **Банникова Л.А., Королева Н.С., Семенихина В.Ф.** Микробиологические основы молочного производства: Справочник. – М.: Агропромиздат, 1987. – 400 с.
3. **Ганина В.И., Королева Н.С., Фильчакова С.А.** Техническая микробиология продуктов животного происхождения: Учеб. пособие. – М.: ДеЛи принт, 2008. – 352 с.
4. **Зимоглядова Т.В., Карташёва И.А., Шабалдас О.Г.** Практикум по микробиологии: Учеб. пособие. – М.: Колос; Ставрополь: АГРУС, 2007. – 148 с.
5. Определитель бактерий Берджи. В 2 т. Пер. с англ. /Под ред. Дж. Хоулта и др. – М.: Мир, 1997. – 432 с.
6. **Слюсаренко Т.П.** Лабораторный практикум по микробиологии пищевых производств. – М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1984. – 208 с.
7. **Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И.** Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для вузов / Под ред. В.К. Шильниковой. 5-е изд., перераб. и доп. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
Правила работы в микробиологической лаборатории.....	4
1. МИКРОСКОПИЯ	5
1.1. Устройство светового микроскопа.....	5
1.2. Основные характеристики светового микроскопа	9
1.3. Правила работы с микроскопом	11
1.4. Микроскопия в темном поле	12
1.5. Фазово-контрастная микроскопия	13
1.6. Люминесцентная микроскопия	14
1.7. Электронная микроскопия	15
2. ОРГАНИЗАЦИЯ И ОБОРУДОВАНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ	18
2.1. Методы и средства стерилизации, применяемые в микробиологической практике.....	18
3. МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	24
3.1. Приготовление фиксированных окрашенных препаратов микроорганизмов	24
3.2. Приготовление прижизненных препаратов микроорганизмов	26
3.3. Приготовление препарата-отпечатка	27
3.4. Красители и индикаторы pH, используемые в микробиологической практике.....	27
4. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ	29
4.1. Питательные среды.....	31
4.2. Техника посевов микроорганизмов на питательные среды	33
5. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ	36
5.1. Классификация грибов. Характеристика некоторых представителей	36
6. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ ДРОЖЖЕЙ	50
6.1. Характеристика некоторых видов культурных и диких дрожжей.....	51
6.2. Определение содержания мертвых и почкующихся клеток в суспензии дрожжей.....	57
6.3. Окрашивание запасных питательных веществ, содержащихся в дрожжевых клетках	59
6.4. Спорообразование у дрожжей	60

7. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ БАКТЕРИЙ.....	62
7.1. Формы бактерий.....	62
7.2. Окрашивание бактерий по Граму.....	64
7.3. Обнаружение подвижности бактерий.....	65
7.4. Окрашивание спор бактерий	66
7.5. Выявление капсул у бактерий	67
8. ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ И ФИЗИОЛОГО- БИОХИМИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ БАКТЕРИЙ.....	69
8.1. Культуральные признаки бактерий.....	69
8.2. Физиолого-биохимические признаки бактерий	72
9. ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ.....	76
9.1. Получение накопительной культуры.....	76
9.2. Выделение чистой культуры	76
9.3. Определение чистоты выделенной культуры	78
9.4. Идентификация выделенной культуры молочнокислых бактерий	78
10. МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО УЧЕТА МИКРООРГАНИЗМОВ.....	82
10.1. Подсчет клеток микроорганизмов в камере Горяева	82
10.2. Непосредственный подсчет клеток под микроскопом (метод Виноградского–Брида).....	83
10.3. Прямой подсчет количества микроорганизмов флуоресцентным методом.....	84
10.4. Метод проточной цитометрии.....	85
10.5. Определение количества микроорганизмов методом мембранного фильтрования	86
10.6. Определение количества микроорганизмов методом подсчета колоний (чашечный метод)	87
10.7. Учет живых микроорганизмов методом предельных разведений	87
10.8. Нефелометрический метод определения биомассы.....	88
11. ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОФЛОРЫ ВОЗДУХА ПОМЕЩЕНИЙ...91	91
11.1. Седиментационный метод	91
11.2. Аспирационный метод	92
12. САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВОДЫ.....95	95
12.1. Отбор проб и подготовка их к анализу.....	95
12.2. Определение общего микробного числа воды.....	96
12.3. Определение содержания колиформных бактерий в воде	97

13. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЧВЫ ..	102
13.1. Определение микробного числа почвы	103
13.2. Определение колититра почвы	103
13.3. Определение перфрингенс-титра почвы	104
13.4. Определение количества термофильных микроорганизмов в почве	104
13.5. Обнаружение в почве палочек протей	105
14. ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ПОРЧУ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ	106
14.1. Род <i>Micrococcus</i>	106
14.2. Род <i>Enterococcus</i>	107
14.3. Род <i>Sarcina</i>	108
14.4. Род <i>Staphylococcus</i>	109
14.5. Род <i>Escherichia</i>	110
14.6. Род <i>Proteus</i>	111
14.7. Род <i>Pseudomonas</i>	111
14.8. Род <i>Bacillus</i>	112
14.9. Род <i>Clostridium</i>	114
15. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ	118
15.1. Определение количества мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ)	118
15.2. Определение бактерий группы кишечных палочек (БГКП) в пищевых продуктах	121
15.3. Определение количества дрожжей и плесеней	123
ПРИЛОЖЕНИЕ	124
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	130

Красникова Людмила Васильевна
Гунькова Полина Исаевна

ОБЩАЯ И ПИЩЕВАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Часть I

Учебное пособие

Ответственный редактор
Т.Г. Смирнова

Редактор
Р.А. Сафарова

Компьютерная верстка
Д.Е. Мышковский

Дизайн обложки
Н.А. Потехина

Подписано в печать 26.04.2016. Формат 60×84 1/16
Усл. печ. л. 7,91. Печ. л. 8,5. Уч.-изд. л. 8,31
Тираж 50 экз. Заказ № С 9

Университет ИТМО. 197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49

Издательско-информационный комплекс
191002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9