

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЛИНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

О. В. Казимирченко

МИКРОБИОЛОГИЯ

Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ
для студентов, обучающихся в бакалавриате по направлению подготовки
19.03.01 Биотехнология (профиль программы «Пищевая биотехнология»)

Калининград
2023

УДК 579.2

Рецензент

кандидат биологических наук, доцент кафедры водных биоресурсов и
аквакультуры ФГБОУ ВО «КГТУ» Е. А. Масюткина

Казимирченко, О. В. Микробиология: учеб.-методич. пособие по выполнению лабораторных работ для студ. бакалавриата по напр. подгот. 19.03.01 Биотехнология (профиль программы «Пищевая биотехнология») / **О. В. Казимирченко.** – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВО «КГТУ», 2023. – 36 с.

В учебно-методическом пособии представлены учебно-методические рекомендации по выполнению лабораторных работ по дисциплине «Микробиология», включающие план проведения занятий, используемое оборудование и материалы, алгоритм проведения и обработки опытных данных, формы отчетов по лабораторным занятиям.

Локальный электронный методический материал. Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ. Рекомендовано к использованию в учебном процессе методической комиссией института рыболовства и аквакультуры ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет» университет» «13» февраля 2023 г., протокол № 10

Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ рекомендовано к использованию в качестве локального электронного методического материала в учебном процессе методической комиссией института агроинженерии и пищевых систем 27 февраля 2023 г., протокол № 02

УДК 579.2

© Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Калининградский государственный технический университет», 2023 г.
© Казимирченко О.В., 2023 г.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1	6
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2	8
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3	10
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №4	11
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5	13
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6	20
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №7	26
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №8	31

ВВЕДЕНИЕ

Целью освоения дисциплины «Микробиология» является формирование знаний о мире микроорганизмов, особенностях их строения, физиологии, биохимических процессах, которые они возбуждают, роли микроорганизмов в круговороте веществ в природе, особенностей отдельных групп микроорганизмов, наиболее распространенных в природе и имеющих значение в порче пищевого сырья и пищевых продуктов, биотехнологии, получении ряда пищевых продуктов, их роли в распространении и возбуждении пищевых заболеваний.

В результате изучения дисциплины студент должен:

знать:

- морфологию, размножение и классификацию микроорганизмов, и их значение в производстве продуктов питания;
- основные биохимические свойства микроорганизмов, вызывающих порчу сырья и пищевых продуктов, возбудителей пищевых отравлений и токсикоинфекций, передающихся через продукты питания;
- основные санитарно-микробиологические требования, предъявляемые к сырью и пищевым продуктам.

уметь:

- провести санитарно-микробиологическое исследование пищевых продуктов, воды, воздуха, технологического оборудования;
- выделить и идентифицировать различные группы бактерий и микроскопических грибов;
- дать санитарно-микробиологическую оценку безопасности продукции и объектов внешней среды.

владеть:

- специфическими правилами техники безопасности работы с микроорганизмами;
- навыками работы с живыми культурами микробов, микроскопическими препаратами, с питательными средами, лабораторным микробиологическим оборудованием;
- методами выделения чистой культуры и идентификации микроорганизмов;
- методиками микробиологического анализа качества пищевых продуктов и объектов окружающей среды.

В результате прохождения лабораторных работ у студентов формируются умения по проведению санитарно-микробиологического исследования пищевых продуктов, воды, воздуха, технологического оборудования, выделению и идентификации различных групп бактерий и микроскопических грибов, по анализу санитарно-микробиологической безопасности продукции и объектов внешней среды.

Студенты приобретают навыки работы с живыми культурами микробов, микроскопическими препаратами, с питательными средами, лабораторным микробиологическим оборудованием, а также навыки по технике выделения чистой культуры и идентификации микроорганизмов, методикам микробиологического анализа качества пищевых продуктов и объектов окружающей среды.

Лабораторные работы по дисциплине проводятся в специализированной микробиологической лаборатории, отвечающей соответствующим требованиям. Выполнение работ осуществляется в лабораторных халатах при строгом соблюдении правил техники безопасности с живыми культурами микроорганизмов, спиртовыми горелками, микроскопами и другим лабораторным оборудованием.

Лабораторная работа №1.

Ознакомление с микробиологической лабораторией, оборудованием и техникой безопасности. Приготовление питательных сред. Тепловая стерилизация и подготовка посуды к ней.

Цель работы: формирование умений и навыков по особенностям техники безопасности при работе с живыми культурами микроорганизмов; изучение методов тепловой и холодной стерилизации, видов питательных сред, освоение методов подготовки лабораторной посуды к стерилизации и приготовления питательных сред.

Задание по работе: прочитать и законспектировать правила работы и техники безопасности в микробиологической лаборатории; подготовить чашки Петри, стеклянные пипетки к тепловой стерилизации; приготовить физиологический раствор и рыбопептонный агар, или иные питательные среды, требуемые для выполнения лабораторных работ, по усмотрению преподавателя; заполнить отчет о работе в табличной форме, сделать выводы.

Материалы и оборудование: демонстрационный материал по видам микробиологической посуды, инструментам, расходным материалам, в том числе одноразового назначения, питательным средам; чашки Петри, пробирки биологические, ватно-марлевые пробки, рыбопептонный агар, хлорид натрия, электронные весы, электроплитка, шпатели, дистиллированная вода, мерные цилиндры.

Методические указания по выполнению работы.

1. Ознакомиться с правилами работы и техники безопасности в микробиологической лаборатории. Внести личные данные и поставить подпись в Журнале регистрации инструктажа по охране труда на рабочем месте для студентов;

2. Завернуть в плотную бумагу чашки Петри и пипетки; перед заворачиванием пипеток в бумагу в конец пипетки, который помещается в дозатор, вставить ватный тампон на глубину не более 1 см. Посуда должна быть подготовлена таким образом, чтобы не оставалось не обернутых бумагой участков.

3. Подготовленную лабораторную посуду передать в стерилизационную комнату для проведения сухожаровой стерилизации;

4. В колбе приготовить 100 мл рыбо-пептонного агара: мерным цилиндром отмерить 100 мл дистиллированной воды, внести определенную навеску сухой питательной среды согласно прописи, указанной на банке со средой.

5. Содержимое колбы размешать, колбу поставить на электроплитку, среду довести до кипения, постоянно помешивая во избежание пригорания среды. Питательный агар прокипятить не менее трех раз до получения прозрачности раствора.

6. Горячий питательный агар в объеме 10 мл разлить по пробиркам. Пробирки закрыть ватно-марлевыми пробками. Собранные пробирки накрыть

бумажным колпачком, на котором написать название питательной среды, связать жгутом.

7. В колбе приготовить 100 мл физиологического раствора: в мерную колбу внести 0,9 г хлорида натрия NaCl, довести объем дистиллированной водой до 100 мл. Содержимое колбы тщательно перемешать.

8. Приготовленный физиологический раствор в объеме 10 мл разлить по пробиркам. Пробирки закрыть ватно-марлевыми пробками. Собранные пробирки накрыть бумажным колпачком, на котором написать название среды, связать жгутом.

9. Подготовленные питательные среды передать в автоклавную для автоклавирования.

10. При необходимости приготовления иных питательных сред руководствоваться соответствующими прописями, указанными на таре, в которой находится питательная среда.

Форма предоставления отчётных материалов.

По результатам проделанной работы заполнить таблицы, сделать выводы.

Таблица 1

Подготовка посуды к стерилизации

Вид лабораторной посуды	Количество лабораторной посуды	Наименование и режим стерилизации лабораторной посуды

Таблица 2

Приготовление питательных сред

Наименование питательных сред	Объем и количество питательной среды (в зависимости от вида лабораторной посуды)	Рецептуры и способ приготовления питательных сред	Наименование и режим стерилизации питательных сред

Вопросы для самопроверки

1. Расскажите о структуре микробиологической лаборатории и правилах работы и технике безопасности.

2. Что такое питательные среды? Каким требованиям они должны соответствовать?

3. На какие группы подразделяются питательные среды в зависимости от состава?

4. На какие группы подразделяются питательные среды в зависимости от физического состояния (консистенции)?

5. На какие группы подразделяются питательные среды в зависимости от назначения?

6. Что такое стерилизация? Какие виды стерилизации Вам известны? Что подвергается стерилизации в микробиологической практике?

7. Расскажите о методах стерилизации питательных сред.

8. Расскажите о методах стерилизации лабораторной посуды.
9. Расскажите о методах стерилизации инструментов и приборов.
10. Расскажите о стерилизации облучением. Для каких целей применяется этот метод?

Лабораторная работа №2

Культивирование микроорганизмов. Посев чистых культур бактерий и плесневых грибов на плотные питательные среды.

Цель работы: формирование умений и навыков по методам культивирования микроорганизмов на питательных средах, особенностям их роста на твердых и жидких питательных средах; пересеву культур бактерий и плесневых грибов на твердые питательные среды.

Задание по работе: пересеять культуры бактерий методом «штриха» в пробирки на скошенный рыбопептонный агар и культуры плесневых грибов в чашку Петри с питательным агаром Сабуро; заполнить отчет о работе в табличной форме, сделать выводы.

Материалы и оборудование: пробирки со стерильным скошенным рыбопептонным агаром, чашки со стерильным агаром Сабуро, пробирки с культурами бактерий (например, бактериями родов *Bacillus*, *Sarcina*, *Aeromonas*), чашки с культурами плесневых грибов (например, культуры плесневых грибов *Penicillium glaucum*, *Aspergillus niger*, *Mucor mucedo*, *Rhizopus nigricans*), карандаши (маркеры) по стеклу, бактериологические петли, вата, марлевые салфетки, спиртовка, спирт этиловый, спички.

Методические указания по выполнению работы.

1. В пламени спиртовки обжечь бактериологическую петлю по всей длине металлической части.

2. Охлаждённую петлю ввести в пробирку с культурой (предварительно обжечь пробку и горлышко пробирки) и аккуратно взять часть бактериального налёта, стараясь не повредить поверхность питательной среды. Обжечь горлышко и пробку, пробирку закрыть и поставить в штатив.

3. Отобранную культуру бактерий перенести в пробирку со стерильным питательным агаром (предварительно обжечь пробку и горлышко пробирки) в конец скоса. Культуру бактерий штрихом распределить по поверхности скоса снизу вверх, не повреждая питательную среду.

4. Обжечь пробку и горлышко пробирки, пробирку закрыть и поместить в штатив. Остатки культуры на петле сжечь в пламени, не допуская разбрызгивания.

5. В пламени спиртовки вновь обжечь бактериологическую петлю по всей длине металлической части.

6. Слегка приоткрыв крышку чашки Петри с выросшей колонией плесневого гриба, взять часть культуры охлаждённой бактериологической петлёй.

7. Закрыв чашку с культурой гриба, слегка приоткрыть чашку со стерильной средой Сабуро, ввести в неё петлю с культурой и сделать несколько штрихов по поверхности питательной среды. Штрихи наносить как можно ближе друг к другу, чтобы полностью засеять поверхность питательной среды в чашке Петри.

8. Остатки культуры плесневого гриба на петле сжечь в пламени спиртовки, не допуская разбрызгивания.

9. Засеянные пробирку и чашку Петри подписать карандашом (маркером) по стеклу с указанием латинского названия культуры микроорганизма, даты посева, фамилии исполнителя.

10. Засеянные пробирки поместить в термостат с установленной температурой 37 °С, чашки Петри - с температурой 25 °С.

Форма предоставления отчётных материалов.

По результатам проделанной работы заполнить таблицы, сделать выводы.

Таблица 1

Пересев культуры бактерий

Наименование бактериальной культуры	Метод и техника посева	Вид питательной среды для посева	Условия инкубации культуры бактерий

Таблица 2

Пересев культуры плесневого гриба

Наименование культуры плесневого гриба	Метод и техника посева	Вид питательной среды для посева	Условия инкубации культуры плесневого гриба

Вопросы для самопроверки

1. Как осуществляют культивирование микроорганизмов?
2. Что такое посев и пересев культур микроорганизмов?
3. Расскажите о технике посева и посева культур микроорганизмов.
4. Как осуществляют пересев культур бактерий или плесневых грибов на плотную питательную среду в чашку Петри?
5. Что такое культуральные признаки микроорганизмов?
6. Какие признаки учитывают при описании роста микроорганизмов в жидкой питательной среде?
7. Какие признаки учитывают при описании колоний микроорганизмов на плотной питательной среде в чашке Петри?
8. Какие признаки учитывают при описании колоний микроорганизмов на скошенном питательном агаре?

Лабораторная работа №3

Культуральные и морфологические признаки бактерий. Простые и сложные методы окраски. Микроскопия препаратов.

Цель работы: формирование умений и навыков по простым и сложным методам окраски бактерий, особенностям микроскопии окрашенных препаратов, изучению культуральных и морфологических признаков бактерий.

Задание по работе: изучить культуральные и морфологические признаки выросшей культуры бактерий на скошенном рыбопептонном агаре; заполнить отчет о работе в табличной форме, сделать выводы.

Материалы и оборудование: выросшие культуры бактерий на скошенном рыбопептонном агаре, набор красителей для окраски по методу Грама, фильтровальная бумага, стеклянная чаша со стеклянным мостиком, бактериологическая петля, предметные стёкла, спиртовая смесь для обезжиривания предметных стекол или кусочки мыла, микроскоп с иммерсионным объективом, иммерсионное масло, вода, карандаши (маркеры) по стеклу, вата, марлевые салфетки, спиртовка, спирт этиловый, спички, песочные часы.

Методические указания по выполнению работы.

1. Охарактеризовать культуральные признаки выросшей культуры бактерий на скошенном рыбопептонном агаре.

2. На обезжиренном предметном стекле приготовить тонкий мазок из культуры бактерий, снятой бактериологической петлёй со скошенного питательного агара.

3. Мазок подсушить над пламенем спиртовки и зафиксировать в пламени.

4. Остуженный мазок окрасить по методу Грама.

5. Окрашенный препарат подсушить фильтровальной бумагой, по центру стекла нанести каплю иммерсионного масла.

6. Препарат, приготовленный из культуры бактерий, микроскопировать. Описать морфологические признаки бактерий (грампринадлежность, форма клеток, их взаимное расположение, наличие или отсутствие в клетках споры), клетки бактерий зарисовать.

Форма предоставления отчётных материалов.

По результатам проделанной работы заполнить таблицы, сделать выводы.

Таблица 1

Культуральные признаки бактерий (*указать таксономическую принадлежность*) со скошенного рыбопептонного агара

Интенсивность и характер роста культуры	Поверхность колонии, оптические свойства колонии	Цвет колонии	Край колонии	Консистенция культуры

Таблица 2

Морфологические признаки бактерий (указать таксономическую принадлежность) на окрашенном препарате

Грампринадлежность	Форма бактерий	Расположение бактерий	Наличие споры у бактерий и ее расположение	Рисунок препарата

Вопросы для самопроверки

1. Назовите основные формы бактериальных клеток.
2. Какое строение имеет бактериальная клетка?
3. Что такое споры бактерий, типы расположения споры в клетке?
4. Расскажите о способе приготовления фиксированного препарата из клеток бактерий.
5. Расскажите о технике окраски бактерий по методу Грама.
6. Как по окрашенному препарату различают грамположительные и грамотрицательные клетки бактерий?
7. Расскажите о технике микроскопирования окрашенного бактериального препарата.
8. Перечислите морфологические признаки бактерий, которые определяются при микроскопии мазка, окрашенного по Граму.

Лабораторная работа №4

Микроскопические грибы (дрожжи и плесневые грибы): культуральные и морфологические признаки.

Цель работы: формирование умений и навыков по особенностям строения и роста на питательных средах микроскопических дрожжевых и плесневых грибов.

Задание по работе: изучить морфологические признаки пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*; охарактеризовать культуральные и морфологические признаки колоний плесневых грибов; заполнить отчет о работе в табличной форме, сделать выводы.

Материалы и оборудование: биологический микроскоп, предметные и покровные стёкла, фуксин, вода, стеклянная чаша со стеклянным мостиком, спиртовка, вода для промывания препарата, иммерсионное масло, бактериологическая петля, жидкая культура дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, культуры плесневых грибов (*Aspergillus niger*, *Penicillium glaucum*, *Rhizopus nigricans*, *Mucor mucedo* или др.) в чашке Петри на плотной питательной среде Сабуро (или Чапека).

Методические указания по выполнению работы.

1. На обезжиренном предметном стекле приготовить тонкий мазок из жидкой культуры пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.
3. Мазок подсушить над пламенем спиртовки и зафиксировать в пламени.

4. Остуженный мазок окрасить фуксином в течение 2 минут, после препарат промыть водой.

5. Препарат подсушить фильтровальной бумагой, по центру стекла нанести каплю иммерсионного масла.

6. Препарат, приготовленный из культуры дрожжей, микроскопировать. Описать морфологические признаки клеток дрожжей: форма клеток, их взаимное расположение, наличие ядер, включений в цитоплазме клеток, наличие клеток в стадии почкования, наличие морфологически изменённых клеток. Препарат зарисовать.

7. Описать культуральные признаки культур плесневых грибов (*Aspergillus niger*, *Penicillium glaucum*, *Rhizopus nigricans*, *Mucor mucedo* или др.), выросших в чашках Петри на среде Сабуро (или Чапека): характер мицелия (плоский, бархатистый, рыхлый, волокнистый, бархатистый, пронизанный шерстистым мицелием), его цвет.

8. Провести микроскопию колоний плесневых грибов. Приготовить препарат «раздавленная капля»: на предметное стекло поместить каплю воды. В каплю двумя препаровальными иглами перенести часть мицелия плесени и хорошо отделить гифы, чтобы мицелий не был слишком плотным. Препарат покрыть покровным стеклом. При увеличении объектива микроскопа $\times(x10)$ изучить общий вид плесени, рассмотреть подробное строение спорообразующего аппарата при увеличении объектива $\times40$. Препарат зарисовать. Колонии плесневых грибов также изучить микроскопированием на месте их роста в чашках Петри. Для этого поместить чашку с колонией плесневого гриба на столик микроскопа, открыть крышку чашки и микроскопировать культуру при малом увеличении объектива ($\times8-10$). При этом во время микроскопирования живой культуры плесневого гриба около микроскопа должна гореть спиртовка.

9. Описать морфологические признаки культуры плесневого гриба: характер гиф (септированные или не септированные), характер спороношения (наличие спорангиев на спорангиеносцах, конидий и их расположение на конидиеносцах). Все виды плесневых грибов зарисовать в тетрадь с указанием таксономической принадлежности исследуемой культуры плесневого гриба.

Форма предоставления отчётных материалов.

По результатам проделанной работы заполнить таблицы, сделать выводы.

Таблица 1

Морфологические признаки пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Форма клетки	Расположение клеток	Наличие вакуолей	Наличие почкующихся клеток	Рисунок препарата

Таблица 2

Культуральные признаки плесневых грибов

Вид плесневого гриба	Характер мицелия	Цвет мицелия	Тип роста на питательной среде

Таблица 3

Морфологические признаки плесневых грибов

Вид плесневого гриба	Характер гифы	Наличие органов спороношения	Рисунок препарата

Вопросы для самопроверки

1. Расскажите о строении дрожжевой клетки, функциях клеточных структур.
2. Расскажите о размножении дрожжей способом почкования и деления.
3. Расскажите о бесполом и половом способах размножения дрожжей.
4. Расскажите о строении клетки плесневого гриба, функциях клеточных структур.
5. Расскажите о вегетативном способе размножения плесневых грибов.
6. Расскажите о бесполом и половом способах размножения плесневых грибов.
7. Перечислите культуральные признаки микроскопических грибов.
8. Назовите и охарактеризуйте методы определения морфологических признаков микроскопических грибов.

Лабораторная работа №5**Санитарно-микробиологические исследования питьевой воды и воздуха.**

Цель работы: формирование умений и навыков по определению безопасности питьевой воды в эпидемическом отношении по микробиологическим показателям и санитарного состояния воздуха в лаборатории.

Задание по работе: провести санитарно-микробиологический посев водопроводной воды и воздуха в микробиологической лаборатории; определить нормируемые показатели качества водопроводной воды, провести сравнение полученных результатов с требованиями Санитарных правил и норм к питьевой воде централизованных систем питьевого водоснабжения, сделать вывод; рассчитать общую микробную обсемененность воздуха в лаборатории, сравнить с установленными требованиями, сделать вывод; изучить состав гетеротрофной микрофлоры воды и воздуха по культуральным и морфологическим признакам; заполнить отчет о работе в табличной форме, сделать выводы.

Материалы и оборудование: стерильная посуда для отбора пробы воды с пробкой и бумажным колпачком, колба или пробирка для прогрева воды, стерильные чашки Петри, чашка с агаром Эндо, чашка с железосульфитным

агаром, пробирка с 10 мл расплавленного железосульфитного агара, пробирки с расплавленным рыбо-пептонным агаром, чашка с рыбо-пептонным агаром, пробирки со средой Гисса с лактозой, стерильные пипетки на 1 мл, дозаторы для пипеток, фильтрационная установка, баня водяная, прокипяченные мембранные фильтры для фильтрования воды, стеклянные цилиндры, стаканчик с этиловым спиртом, реактив для выявления фермента цитохромоксидазы, предметные стекла, набор красителей для окраски препаратов по методу Грама, биологический микроскоп, иммерсионное масло, пинцеты, вата, бактериологическая петля, песочные часы, фильтровальная бумага, стеклянная чаша со стеклянным мостиком, емкость с дезинфицирующим средством, спиртовка, спички, термостаты.

Методические указания по выполнению работы.

I. Отбор пробы воды.

Провести фламбрировку водопроводного крана, открыть кран и полным напором воды спустить воду в течение 10 минут. Далее отобрать пробу воды в стерильный стаканчик.

II. Определение общего микробного числа воды (ОМЧ).

1. После тщательного перемешивания отобранной пробы воды стерильной пипеткой внести по 1 мл в две стерильные чашки Петри, слегка приоткрывая крышки.

2. После внесения воды в каждую чашку влить 10-12 мл расплавленного и остуженного до 45 °С рыбопептонного агара после фламбирования края пробирки, в которой находится питательная среда.

3. Быстро смешать содержимое чашек, равномерно распределяя по всему дну, избегая образования пузырьков воздуха, попадания питательного агара на края и крышку чашки.

4. Чашки оставить на лабораторном столе до застывания агара. После застывания агара чашки с посевами подписать, поместить в термостат вверх дном и инкубировать при температуре (37±1) °С в течение (24 ±2) ч.

5. После термостатирования посевов на чашках с питательным агаром подсчитать все выросшие колонии бактерий, наблюдаемые при увеличении в 2 раза. Учесть только те чашки, на которых выросло не более 300 изолированных колоний.

6. Количество колоний суммировать и разделить на два. Полученный результат выразить целым числом колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл исследуемой пробы воды, принимая во внимание следующие правила выражения результата анализа:

- если ни на одной из чашек нет роста бактерий, результат выражают как «менее 1 КОЕ/мл»;

- если среднеарифметическое количество колоний от 1 до 3, результат выражают как «менее 4 КОЕ/мл»;

- если среднеарифметическое количество колоний равно или более 4, результат выражают как фактическое содержание колониеобразующих единиц в 1 мл воды, т.е. от 4 КОЕ/мл и выше.

7. По росту колоний бактерий в чашке Петри на РПА определить процентное соотношение бактериальных форм в исследуемой воде: подсчитать количество разнотипных колоний бактерий в посевах, описать их по культуральным (описание характера роста колонии бактерий на питательной среде) и морфологическим признакам (описание клеток бактерий на окрашенном препарате при микроскопии). Приняв за 100% общее число колоний в посевах, определить, сколько процентов составляет каждая морфологическая группа.

III. Определение бактерий группы кишечных палочек (БГКП) методом мембранной фильтрации.

1. Провести подготовку фильтровального аппарата: воронку и столик фильтровального аппарата обтереть марлевым (ватным) тампоном, смоченным спиртом, и профламбировать.

2. На столик фильтровального аппарата профламбированным пинцетом положить стерильный мембранный фильтр, прижать его воронкой.

3. Провести фильтрацию 3-х объемов воды по 100 мл или одного объема воды в количестве 300 мл. В воронку залить воду, включить насос, затем профильтровать необходимый объем воды, не допуская осушения фильтра.

4. После окончания фильтрации воды отключить вакуум, воронку снять. Стерильным пинцетом снять мембранный фильтр и перенести его, не переворачивая, на поверхность агара Эндо в чашку Петри. Фильтр поместить так, чтобы между фильтром и поверхностью среды не было пузырьков воздуха. При фильтрации трех объемов воды аналогично размещают на поверхности агара Эндо все три мембранных фильтра.

5. Чашку со средой Эндо и фильтром подписать, поставить в термостат дном вверх и инкубировать при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 2) ч.

6. После термостатирования чашки с агаром Эндо и фильтром провести осмотр роста колоний бактерий на фильтре.

Если на фильтре (фильтрах) нет роста или выросли колонии пленчатые, губчатые, плесневые, прозрачные, расплывчатые, в протоколе анализа записать отрицательный результат анализа: «отсутствие обобщенных колиформных бактерий (ОКБ) и *E. coli* в 100 мл исследуемой воды».

Если на фильтрах обнаружен рост изолированных типичных лактозоположительных колоний: темно-красных, красных с металлическим блеском или без него или розового цвета колоний с отпечатком на обратной стороне фильтра, подсчитать число колоний каждого типа отдельно и приступить к подтверждению их принадлежности к обобщенным колиформным бактериям (ОКБ) и *E. coli*. Каждую подозрительную колонию бактерий исследовать по следующим тестам:

1) Наличие оксидазной активности (определение фермента цитохромоксидазы): на предметное стекло поместить кусочек фильтровальной бумаги, на бумагу нанести каплю смешанного реактива на оксидазу (1% -ный спиртовой α -нафтол и 1%-ный водный β -диметилпарафенилдиамин,

смешанные в соотношении 1:1) и в каплю бактериологической петлей внести часть колонии бактерий.

Реакция считается *положительной*, если в течение 1 мин появляется синее окрашивание культуры бактерий. При *отрицательной* реакции цвет в месте нанесения культуры не меняется.

Для дальнейшего изучения оставить только те колонии, которые дали отрицательный результат, так как БГКП не обладают ферментом цитохромоксидазой.

2) Отношение к окраске по Граму: из оксидазоотрицательных колоний приготовить фиксированный препарат, окрасить его по методу Грама и микроскопировать. Колиформные бактерии являются грамотрицательными бесспоровыми палочками.

3) Ферментация лактозы до кислоты и газа: оксидазоотрицательные грамотрицательные колонии бактерий пересеять методом укола параллельно в две пробирки с лактозной средой (среда Гисса с лактозой). Для определения *E. coli* среда предварительно должна быть прогрета до 43-44°C. Для подтверждения наличия ОКБ одну пробирку с посевом инкубируют при температуре (37±1) °С в течение 48 ч. Для подтверждения наличия *E. coli* вторую пробирку с посевом инкубируют при температуре (44±0,5) °С в течение 24 ч.

После термостатирования пробирок с лактозой провести учет результатов ферментации: при расщеплении лактозы до кислоты и газа происходит изменение цвета среды, образование пузырьков газа или разрывов среды.

7. Окончательный учет результатов анализа проводится по следующим критериям:

- выявление в питьевой водопроводной воде грамотрицательных палочек, не обладающих ферментом цитохромоксидазой, ферментирующих лактозу с образованием кислоты и газа при температуре 37 °С учитывается как присутствие ОКБ. Такие колонии выражают количеством КОЕ ОКБ, обнаруженных в 100 мл воды – «обнаружено ... КОЕ ОКБ в 100 мл».

- выявление в питьевой водопроводной воде грамотрицательных палочек, не обладающих ферментом цитохромоксидазой, ферментирующих лактозу с образованием кислоты и газа при температуре 44 °С учитывается как присутствие *E. coli*. Такие колонии выражают количеством КОЕ *E. coli*, обнаруженных в 100 мл воды – «обнаружено ... КОЕ ОКБ в 100 мл, из них ... КОЕ *E. coli* в 100 мл».

- отсутствие роста колоний бактерий на фильтре или наличие в посевах грамположительных бактерий или отрицательные тесты на оксидазу или ферментацию лактозы указывают на отсутствие общих и (или) термотолерантных колиформных бактерий в 100 мл исследуемой пробы воды. Результат в этом случае выражают как «не обнаружено КОЕ *E. coli* в 100 мл» и (или) «не обнаружено КОЕ *E. coli* в 100 мл».

IV. Определение спор сульфитредуцирующих клостридий.

1. Перед посевом пробирки с железо-сульфитным агаром расплавить на водяной бане. В течение посева поддерживать питательную среду нагретой до 70-80 °С в водяной бане.

2. Отобранную пробу воды в количестве 20 мл прогреть на водяной бане в пробирках или колбах при температуре (75±5) °С в течение 15 мин для исключения вегетативных форм бактерий. При исследовании хлорированной воды прогревание пробы можно не производить.

3. Отобранный объем воды после прогревания профильтровать через мелкопористый мембранный фильтр в фильтрационной установке аналогично описанию выше.

4. После фильтрования мембранный фильтр фламбированным пинцетом взять за два противоположных края и согнутый в виде трубочки поместить в пробирку с горячим железосульфитным агаром. Сторона фильтра с осевшими бактериями должна быть обращена внутрь. При этом фильтр распрямляется и располагается по стенке пробирки. Сразу же после посева пробирку с железосульфитным агаром и фильтром для создания анаэробных условий быстро охладить путем помещения в емкость с холодной водой.

Можно произвести посев в чашку Петри. Для этого в стерильную чашку Петри, залитую тонким слоем железо-сульфитного агара, после фильтрации поместить мембранный фильтр фильтрующей поверхностью вниз так, чтобы под фильтром не было пузырьков воздуха. Затем чашку залить расплавленным железо-сульфитным агаром до верхнего края, чтобы крышка плотно прилегала к среде для создания анаэробных условий.

6. Посевы поместить в термостат и культивировать при температуре (44 ± 1) °С в течение 16-18 ч.

7. После термостатирования в пробирках или чашках с посевами на фильтре и в толще питательной среды учесть колонии черного цвета, характерные для сульфитредуцирующих клостридий, подсчитать их количество.

При отсутствии роста черных колоний на фильтре в протоколе анализа записать «спор сульфитредуцирующих клостридий не обнаружено в 20 мл воды».

При обнаружении роста черных колоний на фильтре в протоколе анализа записать «обнаружено ... КОЕ спор сульфитредуцирующих клостридий в 20 мл воды».

V. Определение санитарного состояния воздуха в лаборатории.

1. Установить чашку с рыбопептонным агаром на любую горизонтальную поверхность на высоту около 1,6-1,8 м от пола.

2. Провести отбор пробы воздуха седиментационным методом: открыть крышку чашки Петри так, чтобы ребро крышки опиралось о ребро доньшка чашки, но не перекрывало поверхность питательного агара.

3. Чашку оставить открытой на 15 минут. Затем закрыть крышку чашки, написать все данные об анализе и термостатировать посев на рыбо-пептонном агаре при температуре 37 °С в течение 48-72 ч.

4. После термостатирования на чашке с рыбопептонным агаром подсчитать число выросших колоний бактерий.

Расчет показателя общей бактериальной обсеменённости воздуха провести согласно расчету В. Л. Омелянского: на площадь 100 см² за 5 минут оседает столько микроорганизмов, сколько их содержится в 10 л воздуха:

$$X = \frac{N \cdot 100 \cdot 1000 \cdot 5}{S \cdot 10 \cdot T}, \text{ КОЕ/м}^3,$$

где X – показатель общей микробной обсемененности воздуха;

100 – 100 см² площади (по Омелянскому);

1000 – пересчет на 1 м³ воздуха;

5 – время экспозиции чашки (по Омелянскому);

S – площадь чашки Петри (63,6 см²);

10 – 10 л воздуха (по Омелянскому);

T – время экспозиции чашки Петри при анализе (T=15 мин.).

5. По вышеприведенной формуле рассчитать нормируемый показатель чистоты воздуха, исходя из того, что в чистом воздухе число колоний бактерий в чашке не должно превышать 200.

Сравнить полученный результат бактериальной обсемененности воздуха с нормативным показателем, сделать вывод.

6. По росту колоний бактерий в чашке Петри с РПА определить процентное соотношение форм микроорганизмов в исследуемой пробе воздуха: подсчитать количество разнотипных колоний бактерий в посевах, описать их по культуральным (описание характера роста колонии бактерий на питательной среде) и морфологическим признакам (описание клеток бактерий на окрашенном препарате при микроскопии). Приняв за 100% общее число колоний в посевах, определить, сколько процентов составляет каждая морфологическая группа.

По общему количеству выросших колоний бактерий сделать заключение о содержании микроорганизмов в воздухе лаборатории, указать доминирующие группы микроорганизмов, указать мероприятия, способствующие поддержанию численности микроорганизмов в воздухе на уровне, не превышающем установленные нормативы.

Форма предоставления отчётных материалов.

По результатам проделанной работы заполнить таблицы, сделать выводы о соответствии исследуемых проб воды и воздуха установленным микробиологическим нормативам безопасности и микробном фоне воды и воздуха.

Таблица 1.

Протокол санитарно-микробиологического исследования питьевой воды.

Микробиологический показатель	Нормируемое значение по СанПиН	Полученный результат
Общее микробное число воды, КОЕ/мл		

Обобщенные колиформные бактерии (ОКБ)		
E. coli		
Споры сульфитредуцирующих клостридий		

Таблица 2.

Микробный фон питьевой воды.

Культуральные признаки	Морфологические признаки	Доля колоний (%) каждого типа в посеве воды
Колонии бактерий I типа		
Колонии бактерий II типа		

Таблица 3.

Протокол санитарно-микробиологического исследования воздуха в лаборатории.

Микробиологический показатель	Нормируемое значение	Результат анализа
Общая бактериальная обсемененность воздуха, КОЕ/м ³		
Количество колоний бактерий		

Таблица 4.

Микробный фон воздуха.

Культуральные признаки	Морфологические признаки	Доля колоний (%) каждого типа в посеве пробы воздуха
Колонии бактерий I типа		
Колонии бактерий II типа		

Вопросы для самопроверки

1. С какой целью осуществляют санитарно-микробиологическое исследование проб питьевой воды и воздуха?
2. Расскажите о правилах отбора проб питьевой воды на микробиологическое исследование.
3. Какие санитарно-микробиологические показатели определяют в питьевой воде централизованных систем питьевого водоснабжения? Каковы их нормируемые значения?
4. Расскажите о методе определения общего микробного числа воды.
5. Расскажите о методе определения общих колиформных и термотолерантных колиформных бактерий в питьевой воде.

6. Расскажите о методе определения спор сульфитредуцирующих клостридий в питьевой воде.

7. Расскажите об определении санитарного состояния воздуха с применением седиментационного метода отбора. Преимущества и недостатки данного метода отбора проб.

8. Какие санитарно-микробиологические показатели определяют обычно в воздухе помещений? Каковы их нормируемые значения?

9. Расскажите об определении общего микробного числа воздуха при применении седиментационного метода отбора?

Лабораторная работа №6 **Биохимические процессы, вызываемые микроорганизмами.**

Цель работы: формирование умений и навыков по изучению роли микроорганизмов при производстве некоторых пищевых продуктов и микробиологической порче.

Задание по работе: провести опыты по спиртовому, молочнокислому, маслянокислому брожениям, гниению (аммонификации) белка. Описать результаты опытов, используя данные визуальных наблюдений за сосудами, качественных реакций на продукты реакции, выделить группы микроорганизмов-возбудителей процесса, определить их морфологические признаки, особенности роста в экспериментальных условиях; заполнить отчет о работе в табличной форме, сделать выводы.

Материалы и оборудование:

Для спиртового брожения. Питательная среда состава, г: сахароза – 15,0; пептон – 0,5; KH_2PO_4 – 0,3; MgSO_4 – 0,1; вода дистиллированная – 100 мл. Колба Эрленмейера или плоскодонная колба на 200-300 мл с затвором Мейсля с серной кислотой H_2SO_4 (рис. 37), сухие пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, электронные весы, 0,1%-ный водный раствор NaOH, йод кристаллический, пробирка биологическая, держатель для пробирок, предметные стекла, бактериологическая петля, спиртовка, раствор фуксина, микроскоп, иммерсионное масло.

Для молочнокислого брожения. Свежее или пастеризованное молоко, колбочки на 50 мл, 0,1 N раствор NaOH, раствор фенолфталеина, бюретка на 50 мл, стакан стеклянный лабораторный типа В или Н вместимостью 100 мл, пипетка градуированная на 10 мл, спирт этиловый или спирто-эфирная смесь 1:1, электроплитка, предметные стекла, бактериологическая петля, спиртовка, раствор метиленового синего, микроскоп, иммерсионное масло.

Для маслянокислого брожения глюкозы. Питательная среда (500 мл): мясо-пептонный бульон с добавлением 3% глюкозы. Круглодонная колба на 500 мл, резиновая пробка с резиновым шлангом и зажимом, вакуумный насос Комовского (рис. 38, а, б), почва, мел, электроплитка, пробирка биологическая, пипетка градуированная на 1 мл, 5%-ный раствор хлорного железа, держатель

для пробирок, предметные стекла, предметные стекла с лункой, покровные стекла, бактериологическая петля, спиртовка, набор красителей для окраски по методу Грама, микроскоп, иммерсионное масло.

Для аммонификации белка. Питательная среда (100 мл): мясо-пептонный бульон. Колба Эрленмейера на 100 мл, ватно-марлевая пробка, кусочек мяса, фильтровальная бумага, смоченная щелочным раствором ацетата свинца ($Pb(CH_3COO)_2$), фильтровальная бумага, смоченная насыщенным раствором щавелевой кислоты, универсальная индикаторная бумага, пергаментная бумага или полиэтиленовый пакет, резинка или нитка, предметные стекла, бактериологическая петля, спиртовка, набор красителей для окраски по методу Грама, микроскоп, иммерсионное масло, вода дистиллированная.

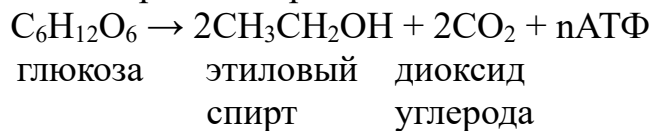
Методические указания по выполнению работы.

Постановка опыта спиртового брожения.

1. В колбу Эрленмейера со 100 мл питательной среды внести 1-2 г сухих пекарских дрожжей. Колбу закрыть резиновой пробкой с затвором Мейсля (рис. 37).
2. Колбу взвесить на электронных весах с точностью до 0,01 г, вес колбы записать в тетрадь.
3. Колбу поместить в термостат при температуре 25 °С на 3-4 суток.

Учет результатов анализа.

1. Записать внешние признаки брожения: образование пены в колбе, характерный запах бражки.
2. Взвесить колбу, не снимая резиновую пробку с затвором Мейсля, и по разнице массы колбы до и после брожения определить массу выделившегося углекислого газа.
3. Рассчитать количество образовавшегося этилового спирта и сброженного сахара, исходя из массы выделившегося углекислого газа в соответствии с уравнением спиртового брожения.



Молекулярные	180	92 (2×46)	88 (2×44)
массы			

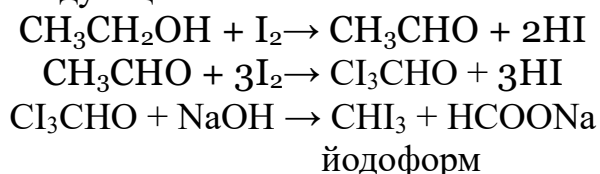
Пример расчёта. В процессе брожения образовалось 6 г CO_2 . Находим массы выделившегося спирта (x) и сброженного сахара (y):

88 г CO_2 соответствуют	92 г CH_3CH_2OH
6 г CO_2 »	x г CH_3CH_2OH
	$x = \frac{6 \cdot 92}{88} = 6,3$ (г)

88 г CO_2 соответствуют	180 г $C_6H_{12}O_6$
6 г CO_2 »	y г $C_6H_{12}O_6$

$$x = \frac{6 \cdot 180}{88} = 12,3 \text{ (г)}$$

4. Провести качественную реакцию на этиловый спирт: в биологическую пробирку налить часть сброженной жидкости, подщелочить ее 1%-ным водным раствором NaOH, нагреть до 60 °С и, добавив кристаллик йода, прокипятить. В присутствии этилового спирта в осадок выпадают мелкие светло-жёлтые кристаллы йодоформа, имеющего характерный резкий сладковатый запах. Процесс проходит по следующей схеме:



Результаты реакции записать в тетрадь.

5. Провести микроскопирование сброженной жидкости: на обезжиренное предметное стекло бактериологической петлей нанести каплю сброженной жидкости вместе с осадком, сделать тонкий мазок, подсушить, зафиксировать, окрасить раствором фуксина в течение 2 минут, стекло промыть водой. Окрашенный препарат микроскопировать с каплей иммерсионного масла. При микроскопии препарата отметить форму дрожжей, их размеры, расположение клеток, наличие в клетках ядер, рассмотреть оболочку, найти почкующиеся клетки. Препарат зарисовать, на рисунке отметить структуры клетки, под рисунком подписать латинское название пекарских дрожжей.

Постановка опыта молочнокислого брожения.

1. В две колбочки налить свежее или пастеризованное молоко, закрыть ватно-марлевыми пробками, одну из колб прокипятить. Колбы с не кипячёным и кипячёным молоком поместить в термостат при температуре 30 °С на 48 ч.

2. Определить начальную кислотность молока: в коническую колбу вместимостью 150-200 см³ отмерить 10 мл свежего или пастеризованного молока, добавить 20 мл дистиллированной воды и 3 капли фенолфталеина. Смесь тщательно перемешать и провести титрование 0,1 N раствором гидроксида натрия NaOH при постоянном взбалтывании до появления устойчивой слабо-розовой окраски, не исчезающей в течение 1 мин. Количество щёлочи, пошедшее на титрование свежего или пастеризованного молока, записать в тетрадь.

Учет результатов анализа.

1. Записать внешние признаки брожения в колбе с не кипячёным и кипячёным молоком: характер и цвет сгустка, запах.

2. Провести микроскопирование сброженной жидкости: приготовить препараты из прокисшего не кипячёного и кипячёного молока. Для этого бактериологическую петлю ввести в сгусток и, повернув вокруг оси, извлечь, прикасаясь ею к пленке, которую образует молочная плесень (*при её наличии на поверхности скисшего молока*). Сгусток распределить по предметному стеклу очень тонким слоем без воды, препарат высушить на воздухе, затем зафиксировать смесью спирта этилового с эфиром (1:1) или этиловым спиртом, несколько раз нанося смесь на мазок и сливая ее. При такой фиксации

извлекается и удаляется жир молока, капли которого мешают окраске и микроскопированию.

Фиксированный препарат окрасить метиленовым синим в течение 2-3 минут, промыть водой, высушить и микроскопировать. На препарате отметить мелкие кокковые клетки, соединённые в цепочки, *Streptococcus lactis* – возбудитель естественного скисания молока, который способствует накоплению в молоке до 1% молочной кислоты. На препарате также могут встретиться тонкие палочки правильной формы, иногда содержащие зёрна волютинина – *Lactobacillus bulgaricus* - возбудитель естественного скисания молока в южных широтах, кислотоустойчивые, накапливают до 3,5% молочной кислоты.

На препаратах из прокисшего кипячёного молока могут регистрироваться споровые маслянокислые клостридии *Clostridium pasteurianum* – толстые палочки, некоторые могут быть со спорами клостридиального или плектридиального типа. Если на поверхности прокисшего молока появилась белая бархатистая плёнка, то в мазке обнаруживаются прямоугольные или овальные клетки молочной плесени, которые отличаются от молочнокислых бактерий большими размерами.

Результаты микроскопии зарисовать в тетрадь, под рисунками подписать латинские названия обнаруженных микроорганизмов. В тетради также записать уравнения реакций гомо- и гетероферментативного молочнокислого брожения.

3. Определить кислотность молока после скисания аналогично описанию выше. По разнице количества щелочи, пошедшего на титрование молока до и после сбраживания, сделать вывод о накоплении в субстрате молочной кислоты.

Постановка опыта маслянокислого брожения глюкозы.

1. В круглодонную колбу со 100 мл питательной среды внести 1-2 г почвы, щепотку мела; колбу пастеризовать на кипящей водяной бане в течение 15 минут.

2. После пастеризации колбу закрыть резиновой пробкой с резиновым шлангом, который соединить со шлангом насоса Комовского. Колбу обернуть полотенцем и, качнув колесо насоса не более трёх раз, откачать из колбы воздух.

3. Пережать резиновый шланг зажимом и отсоединить его от насоса. Колбу поместить в термостат на 7-10 суток при температуре 25-27 °С.

Учет результатов анализа.

1. Записать внешние признаки брожения: наличие пены (газообразования), характерный запах масляной кислоты.

2. Провести качественную реакцию на масляную кислоту: в биологическую пробирку налить 3-5 мл сброженной жидкости, добавить 1-2 мл 5%-ного хлорного железа, вставить пробирку в держатель и жидкость слегка подогреть. В присутствии масляной кислоты образуется маслянокислое железо оранжево-бурого цвета, которое выпадает в осадок. В тетрадь записать результаты проведённой качественной реакции и уравнение реакции.

3. Провести микроскопирование сброженной жидкости: маленькую каплю сброженной жидкости поместить на покровное стекло, подкрасить раствором

Люголя. Покровное стекло поместить каплей над луночкой предметного стекла так, чтобы капля не касалась предметного стекла. Края покровного стекла смазать вазелином, чтобы уменьшить испарение и сохранить в препарате анаэробные условия. На поверхность покровного стекла нанести каплю иммерсионного масла. При микроскопии препарата отметить форму маслянокислых бактерий *Clostridium pasteurianum*, их расположение, наличие цепочек, подвижность, окраску вегетативных клеток и клеток со спорами. Микроскопический препарат можно приготовить на предметном стекле с последующей фиксацией и окраской мазка по методу Грама.

Результаты микроскопии зарисовать в тетрадь, под рисунками подписать латинские названия обнаруженных бактерий. В тетради также записать уравнение реакции маслянокислого брожения глюкозы.

Постановка опыта аммонификации белковых веществ (гниения).

1. В колбу Эрленмейера с 30 мл питательной среды добавить кусочек мяса.

2. Под ватно-марлевую пробку подвесить лакмусовую бумажку, смоченную дистиллированной водой, для обнаружения выделяющегося аммиака, а также индикаторные бумажки, пропитанные уксуснокислым свинцом и щавелевой кислотой, для обнаружения выделяющихся сероводорода и индола, соответственно. Бумажки не должны касаться питательной среды и друг друга.

3. Колбу закрыть ватно-марлевой пробкой, сверху пробку затянуть пергаментной бумагой или полиэтиленовым пакетом и поместить в термостат на 5-6 суток при температуре 28-30 °С.

Учет результатов анализа.

1. Записать внешние признаки процесса в колбе: отметить наличие постороннего (часто – тошнотворного) запаха и изменение окраски лакмусовой и индикаторных бумажек. При выделении аммиака лакмусовая бумага окрашивается в синий цвет, при выделении сероводорода фильтровальная бумага, смоченная ацетатом свинца, чернеет; если она покрывается серебристым налётом, значит, наряду с H_2S выделяются еще и меркаптаны (например, метилмеркаптан CH_3SH). При образовании индола лакмусовая бумага, смоченная насыщенным раствором щавелевой кислоты, окрашивается в розовый цвет.

2. Провести микроскопирование жидкости из колбы: на обезжиренное предметное стекло нанести каплю субстрата из колбы, препарат высушить, зафиксировать и окрасить по методу Грама. При микроскопии можно обнаружить грамтрицательные палочковидные бесспорные гнилостные бактерии *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, аэробные споровые бактерии рода *Bacillus*, анаэробные палочки рода *Clostridium* с кластридиально расположенными спорами.

Результаты микроскопии зарисовать в тетрадь, под рисунками подписать латинские названия обнаруженных бактерий. В тетради также записать схему

гидролиза белка и уравнения реакций распада аминокислот с учетом выявленных продуктов аммонификации.

Форма предоставления отчётных материалов.

По результатам проделанной работы заполнить таблицы, сделать выводы о характере течения биохимических процессов и участвующих в них группах микроорганизмов.

Таблица 1

Учет результатов спиртового брожения

Описание внешних признаков брожения в колбе (пена, запах)	Описание микроскопического препарата, рисунок препарата	Расчет количества сброженного сахара и образовавшегося этилового спирта	Химическое уравнение брожения	Вывод

Таблица 2

Учет результатов молочнокислого брожения

Описание внешних признаков брожения в колбе (характер и цвет сгустка, запах)	Описание микроскопического препарата, рисунок препарата	Расчет кислотности молока до и после брожения	Химическое уравнение брожения	Вывод
<i>не кипяченое молоко</i>				
<i>кипяченое молоко</i>				

Таблица 3

Учет результатов маслянокислого брожения глюкозы

Описание внешних признаков брожения в колбе (пена, запах)	Описание микроскопического препарата, рисунок препарата	Результаты качественной реакции на масляную кислоту	Химическое уравнение брожения	Вывод

Таблица 4

Учет результатов аммонификации белков

Описание внешних признаков процесса в колбе (запах)	Образование продуктов распада белка	Описание микроскопического препарата, рисунок препарата	Схема гидролиза белка	Химические уравнения реакций распада аминокислот	Вывод
	выделение NH ₃ , H ₂ S, образование				

Вопросы для самопроверки

1. Напишите уравнение реакции спиртового брожения. Назовите и охарактеризуйте возбудителей брожений. Какое практическое значение имеет этот процесс в пищевых производствах?

2. Напишите уравнения реакций молочнокислого брожения. Назовите и охарактеризуйте возбудителей брожений. Какое практическое значение имеет этот процесс в пищевых производствах?

3. Напишите уравнения реакций маслянокислого брожения глюкозы. Назовите и охарактеризуйте возбудителей брожений. Какое практическое значение имеет этот процесс в пищевых производствах?

4. Напишите схему микробиологического распада белка, уравнения реакций образования продуктов распада аминокислот. Назовите и охарактеризуйте возбудителей аммонификации (гниения) белка. Какое практическое значение имеет этот процесс в пищевых производствах?

Лабораторная работа №7

Санитарно-микробиологический анализ смывов с рук, поверхностей.

Цель работы: формирование умений и навыков по определению микробной чистоты рук, поверхностей до и после обработки дезинфицирующими средствами.

Задание по работе: ознакомиться с правилами отбора проб, провести санитарно-микробиологические посевы смывов рук, поверхностей до и после обработки дезинфицирующими средствами; определить нормируемые показатели микробной чистоты рук, поверхностей, провести сравнение полученных результатов с требованиями нормативных документов; заполнить отчет о работе в табличной форме, сделать выводы.

Материалы и оборудование: пробирки с 10 мл физиологического раствора, стерильные чашки Петри, пробирки со средой Кесслера, рыбопептонный агар, стерильные пипетки на 1 мл, дозаторы для пипеток, стерильные трафареты для смывов, стерильные палочки с ватными тампонами для смывов, дезинфицирующие средства, предметные стекла, набор красителей для окраски препаратов по методу Грама, реактив для определения наличия цитохромоксидазы, бумага фильтровальная, биологический микроскоп, иммерсионное масло, пинцеты, вата, бактериологическая петля, песочные часы, фильтровальная бумага, стеклянная чаша со стеклянным мостиком, емкость с дезинфицирующим средством, спиртовка, спички, термостаты.

Методические указания по выполнению работы.

I. Проведение смывов с рук.

1. Вскрыть упаковку со стерильной палочкой с ватным тампоном, предназначенной для проведения смывов.

2. Ватный тампон увлажнить в стерильном физиологическом растворе, помещённым в пробирку.

3. Произвести смыв с необработанной руки согласно правилам, прописанным в соответствующей нормативной документации. При проведении смывов периодически увлажнять ватный тампон в физиологическом растворе.

4. После окончания проведения смыва палочку с ватным тампоном опустить в пробирку с физиологическим раствором. Пробирку встряхнуть, оставить на 2-3 минуты в штативе.

5. Обработать руки дезинфицирующим средством.

6. Провести смыв аналогично методике проведения смыва с необработанной руки.

7. После окончания проведения смыва палочку с ватным тампоном опустить в соответствующую пробирку с физиологическим раствором. Пробирку встряхнуть, оставить на 2-3 минуты в штативе.

II. Определение общей бактериальной обсемененности смывов с рук.

1. Стерильной пипеткой внести по 1 мл соответствующего смыва в стерильные чашки Петри, слегка приоткрывая крышки.

2. После внесения смывной воды в каждую чашку влить 10-12 мл расплавленного и остуженного до 45 °С рыбопептонного агара после фламбирования края пробирки, в которой находится питательная среда.

3. Быстро смешать содержимое чашек, равномерно распределяя по всему дну, избегая образования пузырьков воздуха, попадания питательного агара на края и крышку чашки.

4. Чашки оставить на лабораторном столе до застывания агара. После застывания агара чашки с посевами подписать, поместить в термостат вверх дном и инкубировать при температуре (37±1) °С в течение 48-72 ч.

5. После термостатирования посевов на чашках с питательным агаром подсчитать все выросшие колонии бактерий, наблюдаемые при увеличении в 2 раза.

6. Количество колоний умножить на 10, где 10 – 10 мл смывной воды. Полученный результат выразить целым числом колониеобразующих единиц (КОЕ) на ладонь (КОЕ/ладонь). Провести сравнение полученных показателей общей бактериальной обсемененности рук до и после обработки, сделать вывод о бактерицидных свойствах используемого дезинфицирующего средства.

7. По росту колоний бактерий в чашке Петри на РПА определить процентное соотношение бактериальных форм в исследуемых смывах: подсчитать количество разнотипных колоний бактерий в посевах, описать их по культуральным (описание характера роста колонии бактерий на питательной среде) и морфологическим признакам (описание клеток бактерий на окрашенном препарате при микроскопии). Приняв за 100% общее число колоний в посевах, определить, сколько процентов составляет каждая морфологическая группа.

III. Определение бактерий группы кишечных палочек (БГКП) в смывах с рук.

1. В стерильную среду Кесслера опустить палочку с ватным тампоном, которой производили смыв, и стерильной пипеткой внести 0,2 см³ смывной жидкости.

2. Посев на среде Кесслера поместить в термостат и инкубировать при температуре (37±1) °С в течение 18-24 ч.

3. После инкубации из газ-положительных пробирок со среды Кесслер произвести высев с помощью бактериологической петли методом штриха на агар Эндо в чашку Петри.

При отсутствии признаков роста в среде Кесслера – газообразования или изменения цвета среды – дают заключение об отсутствии в смывах БГКП.

4. Чашку с посевом на среде Эндо поместить в термостат и инкубировать при температуре (37±1) °С в течение 18-24 ч.

5. После инкубирования на чашке с агаром Эндо посмотреть наличие колоний, характерных для БГКП: темно-красные, красные с металлическим блеском или без него или розового цвета.

6. Каждую подозрительную колонию бактерий исследовать по следующим тестам:

1) Наличие оксидазной активности (определение фермента цитохромоксидазы): на предметное стекло поместить кусочек фильтровальной бумаги, на бумагу нанести каплю смешанного реактива на оксидазу (1% -ный спиртовой α-нафтол и 1%-ный водный β-диметилпарафенилдиамин, смешанные в соотношении 1:1) и в каплю бактериологической петлей внести часть колонии бактерий.

Реакция считается *положительной*, если в течение 1 мин появляется синее окрашивание культуры бактерий. При *отрицательной* реакции цвет в месте нанесения культуры не меняется.

Для дальнейшего изучения оставить только те колонии, которые дали отрицательный результат, так как БГКП не обладают ферментом цитохромоксидазой.

2) Отношение к окраске по Граму: из оксидазоотрицательных колоний приготовить фиксированный препарат, окрасить его по методу Грама и микроскопировать.

7. В случае обнаружения в препарате грамотрицательных, не образующих спор палочек дают заключение о том, что в смывах присутствуют БГКП.

IV. Проведение смывов с поверхностей.

1. Вскрыть упаковку со стерильной палочкой с ватным тампоном, предназначенной для проведения смывов.

2. Ватный тампон увлажнить в стерильном физиологическом растворе, помещённым в пробирку.

3. Произвести смыв с необработанной поверхности согласно правилам, прописанным в соответствующей нормативной документации. Смыв с поверхности ограничить стерильным трафаретом площадью 100 см². При проведении смывов периодически увлажнять ватный тампон в физиологическом растворе.

4. После окончания проведения смыва палочку с ватным тампоном опустить в пробирку с физиологическим раствором. Пробирку встряхнуть, оставить на 2-3 минуты в штативе.

5. Обработать поверхность дезинфицирующим средством.

6. Провести смыв аналогично методике проведения смыва с необработанной поверхности.

7. После окончания проведения смыва палочку с ватным тампоном опустить в соответствующую пробирку с физиологическим раствором. Пробирку встряхнуть, оставить на 2-3 минуты в штативе.

V. Определение общей бактериальной обсемененности смывов с поверхностей.

1. Пробирки со смывами с поверхностей встряхнуть, оставить на 2-3 минуты. Далее стерильной пипеткой внести по 1 мл соответствующего смыва в стерильные чашки Петри, слегка приоткрывая крышки.

2. После внесения смывной воды в каждую чашку влить 10-12 мл расплавленного и остуженного до 45 °С рыбопептонного агара после фламбирования края пробирки, в которой находится питательная среда.

3. Быстро смешать содержимое чашек, равномерно распределяя по всему дну, избегая образования пузырьков воздуха, попадания питательного агара на края и крышку чашки.

4. Чашки оставить на лабораторном столе до застывания агара. После застывания агара чашки с посевами подписать, поместить в термостат вверх дном и инкубировать при температуре (37±1) °С в течение 48-72 ч.

5. После термостатирования посевов на чашках с питательным агаром подсчитать все выросшие колонии бактерий, наблюдаемые при увеличении в 2 раза.

6. Количество колоний, соответствующее 100 см² поверхности, пересчитать на 1 см² и далее умножить на 10, где 10 – 10 мл смывной воды. Полученный результат выразить целым числом колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 см² поверхности. Провести сравнение полученных показателей общей бактериальной обсемененности поверхностей до и после обработки, сделать вывод о бактерицидных свойствах используемого дезинфицирующего средства.

7. По росту колоний бактерий в чашке Петри на РПА определить процентное соотношение бактериальных форм в исследуемых смывах: подсчитать количество разнотипных колоний бактерий в посевах, описать их по культуральным (описание характера роста колонии бактерий на питательной среде) и морфологическим признакам (описание клеток бактерий на окрашенном препарате при микроскопии). Приняв за 100% общее число колоний в посевах, определить, сколько процентов составляет каждая морфологическая группа.

Форма предоставления отчётных материалов.

По результатам проделанной работы заполнить таблицы, сделать выводы о соответствии исследуемых смывов установленным микробиологическим

нормативам безопасности, бактерицидных свойствах дезинфицирующих средств, использованных для обработки рук и поверхностей, микробном фоне смывов.

Таблица 1.

Протокол санитарно-микробиологического исследования смывов с рук

Микробиологический показатель	Нормируемое значение	Полученный результат
Общая бактериальная обсемененность: - рука до обработки - рука после обработки... <i>указать дезинфицирующее средство</i>		
БГКП: - рука до обработки - рука после обработки... <i>указать дезинфицирующее средство</i>		

Таблица 2.

Микробный фон смывов с рук.

Культуральные признаки	Морфологические признаки	Доля колоний (%) каждого типа в смывах
Колонии бактерий I типа		
Колонии бактерий II типа		

Таблица 3.

Протокол санитарно-микробиологического исследования смывов с поверхностей.

Микробиологический показатель	Нормируемое значение	Полученный результат
Общая бактериальная обсемененность: - поверхность до обработки - поверхность ... <i>указать дезинфицирующее средство</i>		

Таблица 4.

Микробный фон смывов с поверхностей

Культуральные признаки	Морфологические признаки	Доля колоний (%) каждого типа в посевах пробы воздуха
Колонии бактерий I типа		
Колонии бактерий II типа		

Вопросы для самопроверки

1. С какой целью осуществляют санитарно-микробиологическое исследование чистоты рук и поверхностей на пищевых производствах?

2. Расскажите о правилах смывов с рук. Какова периодичность проведения смывов с рук персонала на пищевых производствах?

3. Какие санитарно-микробиологические показатели определяют в смывах с рук персонала? Каковы их нормируемые значения?

4. Расскажите о методе определения общей бактериальной обсемененности смывов с рук.

5. Расскажите о методе определения бактерий группы кишечных палочек в смывах с рук.

6. Расскажите о правилах смывов с поверхностей. Какова периодичность проведения смывов с поверхностей, оборудования на пищевых производствах

7. Какие санитарно-микробиологические показатели определяют в смывах с поверхностей? Каковы их нормируемые значения?

8. Расскажите о методе определения общей бактериальной обсемененности смывов с поверхностей.

Лабораторная работа №8

Санитарно-микробиологический анализ пищевых продуктов.

Цель работы: формирование умений и навыков по определению микробиологической безопасности пищевых продуктов.

Задание по работе: провести санитарно-микробиологические посеы пищевых продуктов методом серийных десятикратных разведений; определить нормируемые микробиологические показатели, провести сравнение полученных результатов с требованиями нормативных документов; изучить микробный фон продукта по разнотипным колониям бактерий, заполнить отчет о работе в табличной форме, сделать выводы.

Материалы и оборудование: пробы пищевых продуктов, колба с 90 мл физиологического раствора, пробирки с 9 мл физиологического раствора, стерильные чашки Петри, расплавленный рыбопептонный агар в пробирках, пробирка со средой Кесслера, расплавленный агар Сабуро в пробирках, стерильные пипетки на 1 мл, дозаторы для пипеток, предметные стекла, набор красителей для окраски препаратов по методу Грама, реактив для определения наличия цитохромоксидазы, бумага фильтровальная, биологический микроскоп, иммерсионное масло, пинцеты, вата, бактериологическая петля, песочные часы, фильтровальная бумага, стеклянная чаша со стеклянным мостиком, емкость с дезинфицирующим средством, спиртовка, спички, термостаты.

Методические указания по выполнению работы.

I. Приготовление 10-кратных разведений пищевого продукта.

1. В стерильной ступке взвесить 10 г исследуемого продукта, измельчить навеску стерильным пестиком и перенести в колбу с 90 мл физиологического раствора (разведение 1:10). Содержимое колбы тщательно перемешать. После перемешивания дать частицам продукта осесть в течение одной-двух минут.

2. Стерильной пипеткой 1 мл суспензии из колбы перенести в первую пробирку с 9 мл физиологического раствора (разведение 1:100). Конец пипетки

следует опускать в пробирку с физиологическим раствором не более чем на 3 мм, чтобы не смыть бактерий с ее поверхности.

3. Другой стерильной пипеткой размешать содержимое пробирки разведения 1:100 путем многократного втягивания суспензии в пипетку и ее последующего выдувания. Затем 1 мл суспензии перенести в следующую пробирку с 9 мл физиологического раствора (разведение 1:1000). Далее аналогичным образом провести последующее разведение продукта до получения разведения 1:10000.

II. Определение общей бактериальной обсемененности пищевого продукта (показатель КМАФАнМ).

1. После приготовления разведений провести высев 1 мл суспензии в четыре стерильные чашки Петри. При высеве суспензии разрешается пользоваться одной пипеткой, но высев следует проводить, начиная с наибольшего (последнего) разведения.

2. Суспензию в четырех чашках Петри каждого разведения залить расплавленным и охлажденным до 40-45 °С РПА.

3. Посевы на РПА поместить в термостат, перевернув чашки доньшком вверх, при температуре 30°C на 72 ч.

4. По каждому разведению подсчитать число выросших колоний бактерий в чашках Петри с РПА, при этом в учет берут чашки, в которых выросло от 15 до 300 колоний.

5. Провести расчет показателя КМАФАнМ (количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных бактерий) по формуле:

$$\text{КМАФАнМ} = \frac{\text{число колоний бактерий в чашке Петри}}{\text{объем внесенной суспензии в чашку}} \cdot 10^n, \text{ КОЕ/г (см}^3\text{)},$$

где 10^n – степень разведения навески продукта.

Рассчитав показатель по каждому разведению, вывести среднее значение общей бактериальной обсемененности исследуемого продукта. Результат выразить числом от 1,0 до $9,9 \times 10^n$ КОЕ/г (см³).

Полученный результат сравнить с нормативным значением показателя КМАФАнМ, определенного в нормативной документации для исследуемого пищевого продукта.

6. В чашках с РПА выделить различные типы колоний бактерий, описать их культуральные признаки.

7. Приготовить мазки на обезжиренном предметном стекле, мазки зафиксировать и окрасить по методу Грама. При микроскопии описать морфологические признаки бактерий, определить грампринадлежность.

III. Определение бактерий группы кишечных палочек (БГКП) (колиформных бактерий).

1. Из первого разведения (1:10) стерильной пипеткой произвести высев 1 мл суспензии в среду Кесслера.

2. Посев на среде Кесслера поместить в термостат и инкубировать при температуре (37±1) °С в течение 18-24 ч.

3. После инкубации из газ-положительных пробирок со среды Кесслер произвести высев с помощью бактериологической петли методом штриха на агар Эндо в чашку Петри.

При отсутствии признаков роста в среде Кесслера – газообразования, помутнения или изменения цвета среды – дают заключение об отсутствии в пищевых продуктах БГКП.

4. Чашку с посевом на среде Эндо поместить в термостат и инкубировать при температуре (37 ± 1) °С в течение 18-24 ч.

5. После инкубирования на чашке с агаром Эндо посмотреть наличие колоний, характерных для БГКП: темно-красные, красные с металлическим блеском или без него или розового цвета.

6. Каждую подозрительную колонию бактерий исследовать по следующим тестам:

1) Наличие оксидазной активности (определение фермента цитохромоксидазы): на предметное стекло поместить кусочек фильтровальной бумаги, на бумагу нанести каплю смешанного реактива на оксидазу (1% -ный спиртовой α -нафтол и 1%-ный водный β -диметилпарафенилдиамин, смешанные в соотношении 1:1) и в каплю бактериологической петлей внести часть колонии бактерий.

Реакция считается *положительной*, если в течение 1 мин появляется синее окрашивание культуры бактерий. При *отрицательной* реакции цвет в месте нанесения культуры не меняется.

Для дальнейшего изучения оставить только те колонии, которые дали отрицательный результат, так как БГКП не обладают ферментом цитохромоксидазой.

2) Отношение к окраске по Граму: из оксидазоотрицательных колоний приготовить фиксированный препарат, окрасить его по методу Грама и микроскопировать.

3) Ферментация лактозы до кислоты и газа: оксидазоотрицательные грамотрицательные колонии бактерий пересеять методом укола в пробирку с лактозной средой (среда Гисса с лактозой). Пробирку с посевом инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ± 3 ч.

После термостатирования пробирок с лактозой провести учет результатов ферментации: при расщеплении лактозы до кислоты и газа происходит изменение цвета среды, образование пузырьков газа или разрывов среды.

7. В случае обнаружения грамотрицательных, не образующих спор палочек, оксидазоотрицательных, сбрасывающих лактозу с образованием кислоты и газа дают заключение о том, что в пищевом продукте присутствуют БГКП (колиформные бактерии).

IV. Определение обсемененности пищевого продукта плесневыми и дрожжевыми грибами.

1. Из первых двух разведений (1:10 и 1:100) стерильной пипеткой провести высев 1 мл суспензии в стерильные чашки Петри. При высеве

суспензии разрешается пользоваться одной пипеткой, но высеv следует проводить, начиная с наибольшего (последнего) разведения.

2. Суспензию в чашках Петри каждого разведения залить расплавленным и охлажденным до 40-45 °С агаром Сабуро.

3. Посевы с агаром Сабуро поместить в термостат, крышками вверх, при температуре (25±1) °С на 5 суток.

4. По каждому разведению подсчитать отдельно число выросших колоний плесневых и дрожжевых грибов.

Для идентификации дрожжей и плесеней описать культуральные признаки.

Рост дрожжевых грибов сопровождается образованием крупных, выпуклых, блестящих серовато-белых или других цветов колоний с гладкой поверхностью и ровным краем.

Колонии дрожжей для отличия от колоний бактерий окрасить фуксином в течение 2 минут и микроскопировать. Дрожжи представляют собой крупные клетки овальной, круглой или цилиндрической формы, с ядрами и вакуолями в цитоплазме.

Плесневые грибы образуют мицелий в виде пушистого налета различной окраски.

Для подсчета дрожжей отобрать чашки, где выросло от 15 до 150 колоний, плесневых грибов – чашки с количеством колоний от 5 до 50.

5. Обсемененность пищевого продукта дрожжевыми и плесневыми грибами на 1 г или 1 см³ пробы рассчитать исходя из количества колоний, выросших на чашках Петри с агаром Сабуро, с учетом разведения, используемого для посева.

6. Полученный результат сравнить с нормативным значением показателя по дрожжам и плесеням, определенного в нормативной документации для исследуемого пищевого продукта.

Форма предоставления отчётных материалов.

По результатам проделанной работы заполнить таблицы, сделать выводы о соответствии исследованного образца пищевого продукта установленным микробиологическим нормативам безопасности. Описать микробный фон продукта по морфологии клеток бактерий и грампринадлежности.

Таблица 1.

Протокол санитарно-микробиологического исследования пищевого продукта
(указать наименование продукта, дату изготовления, срок годности)

Микробиологический показатель	Нормируемое значение	Полученный результат
КМАФАнМ		
БГКП (колиформные бактерии)		
Дрожжи		
Плесени		

Таблица 2.

Микробный фон пищевого продукта

Культуральные признаки	Морфологические признаки	Доля колоний (%) каждого типа в посеве пробы воздуха
Колонии бактерий I типа		
Колонии бактерий II типа		

Вопросы для самопроверки

1. С какой целью осуществляют санитарно-микробиологическое исследование пищевых продуктов?
2. Расскажите о правилах отбора проб продуктов на микробиологическое исследование.
3. Какие группы микроорганизмов нормируются в пищевых продуктах?
4. Расскажите о методе 10-кратных разведений пищевого продукта.
5. Расскажите о методе определения общей бактериальной обсемененности пищевого продукта (показатель КМАФАнМ).
6. Приведите формулу расчета показателя КМАФАнМ, единицы измерения.
7. Расскажите о методе определения бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий).
8. Как нормируются БГКП в пищевых продуктах?
9. Расскажите о методе определения обсемененности пищевого продукта дрожжевыми и плесневыми грибами.
10. Как рассчитывают обсемененность пищевого продукта дрожжевыми и плесневыми грибами, единицы измерения?

Локальный электронный методический материал

Оксана Владимировна Казимирченко

МИКРОБИОЛОГИЯ

Редактор И. Голубева

Локальное электронное издание

Уч.-изд. л. 2,4. Печ. л. 2,2.

Издательство федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего образования
«Калининградский государственный технический университет»
236022, Калининград, Советский проспект, 1