

Документ подписан простой электронной подписью
Информация о владельце:
ФИО: Локтионова Оксана Геннадьевна
Должность: проректор по учебной работе
Дата подписания: 30.10.2023 10:45:09
Уникальный программный ключ:
0b817ca911e6668abb13a5d426d39e5f1c11eabbf73e943df4a4851fda56d089

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Юго-Западный государственный университет»
(ЮЗГУ)

Кафедра товароведения, технологии и экспертизы товаров



ПИЩЕВАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Методические указания по выполнению лабораторных работ для студентов направления 19.03.02 «Продукты питания из растительного сырья»

Курск 2022

УДК: 579.2

Составитель: А.Г. Беляев

Рецензент

Кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *А.Г. Калужских*

Пищевая микробиология: методические указания по выполнению лабораторных работ / Юго-Зап. гос. ун-т; сост.: А.Г. Беляев, Курск, 2022. 75 с.: Библиогр.: с.75

Приводится перечень лабораторных работ, цель их выполнения, материальное обеспечение, вопросы для подготовки, краткие теоретические сведения, задания, рекомендуемая литература.

Предназначены для студентов направления подготовки 19.03.02 «Продукты питания из растительного сырья» очной, заочной и сокращенной форм обучения.

Текст печатается в авторской редакции

Подписано в печать 17.01.2022. Формат 60x84 1/16.
Усл. печ. л. 4,35 Уч.-изд. л. 3,94 Тираж 50 экз. Заказ. 546, Бесплатно.
Юго-Западный государственный университет.
305040, г. Курск, ул. 50 лет Октября, 94.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Лабораторная работа №1 Правила безопасной работы в лаборатории микробиологии. Устройство микроскопа и правила работы с микроскопом. Виды и техника микроскопирования.	6
Лабораторная работа №2 Методы окраски бактерий. Приготовление и микроскопирование фиксированных окрашенных препаратов. Морфология бактерий.	16
Лабораторная работа №3 Морфология мицелиальных грибов и дрожжей. Приготовление и изучение препаратов из живых микроорганизмов.	21
Лабораторная работа №4 Культивирование микроорганизмов. Типы питательных сред и их приготовление.	29
Лабораторная работа №5 Изучение биохимических свойств микроорганизмов.	40
Лабораторная работа №6 Санитарно-гигиенический контроль на предприятиях отрасли.	45
Лабораторная работа №7 Исследование производственных дрожжей.	53
Лабораторная работа №8 Микробиологическое исследование продуктов питания (занятие 1).	65
Лабораторная работа №9 Микробиологическое исследование продуктов питания (занятие 2).	72
Список рекомендательной литературы	75

ВВЕДЕНИЕ

Методические указания к выполнению лабораторных работ предназначены для студентов направления для студентов направления подготовки 19.03.02 «продукты питания из растительного сырья» с целью закрепления и углубления ими знаний, полученных на лекциях и при самостоятельном изучении учебной литературы,

Методические указания разработаны в соответствии с требованиями Федерального государственного образовательного стандарта. Перечень лабораторных работ, их объем соответствуют учебному плану и рабочей программе дисциплины. При подготовке к занятиям студенты должны изучить соответствующий теоретический материал по учебной литературе, приобрести умения по методам микробиологических исследований; приобрести знания и умения в области санитарии предприятий отрасли, необходимые будущему специалисту для поддержания высокого санитарного состояния производства, строгого соблюдения технологических условий для получения качественной продукции конспекту лекций, выполнить задания для самостоятельной работы. Студенты должны ознакомиться с содержанием и порядком выполнения лабораторной работы.

Каждое занятие содержит цель его выполнения, материальное обеспечение, рекомендуемые для изучения литературные источники, вопросы для подготовки, краткие теоретические сведения, задания для выполнения. При выполнении лабораторных работ основным методом обучения является самостоятельная работа студентов с высоким уровнем индивидуализации заданий под руководством преподавателя. Результаты выполненных каждым студентом заданий обсуждаются в конце занятий. Оценка преподавателем лабораторной работы студента осуществляется комплексно: по результатам выполненного задания, устному сообщению и качеству оформления работы, что может быть учтено в рейтинговой оценке знаний студента.

Правила оформления работ

1. Отчеты по каждой теме лабораторного занятия оформляются в отдельной тетради.
 2. Перед оформлением каждой работы студент должен четко написать ее название, цель выполнения, краткие ответы на вопросы для подготовки, объекты и результаты исследования. Если предусмотрено оформление работ в виде таблиц, то необходимо все результаты занести в таблицу в тетради. После каждого задания должно быть сделано заключение с обобщением, систематизацией или обоснованием результатов исследований.
 3. Каждую выполненную работу студент защищает в течение учебного семестра.
- Выполнение и успешная защита лабораторных работ являются допуском к сдаче теоретического курса на экзамене.

Лабораторная работа №1

Правила безопасной работы в лаборатории микробиологии. Устройство микроскопа и правила работы с микроскопом. Виды и техника микроскопирования.

Цель работы: Изучить правила безопасной работы в лаборатории микробиологии. Изучить устройство светового биологического микроскопа и освоить правила работы с ним. Ознакомиться с различными видами микроскопии.

Оборудование, материалы: Микроскоп; бактериологические петли; предметные стекла; спиртовка; иммерсионное масло; фильтровальная бумага; готовые препараты микроорганизмов.

Правила работы в микробиологической лаборатории

1. В лабораторию запрещается входить в верхней одежде и класть на столы сумки, пакеты и другие личные вещи;
2. В лаборатории разрешается работать только в халатах;
3. На каждом занятии назначаются дежурные, которые следят за порядком и за выполнением каждым студентом правил работы и поведения в лаборатории;
4. За каждой группой студентов (3 человека) закрепляется постоянное рабочее место, которое должно содержаться в порядке на протяжении всего занятия;
5. Бактериологические петли и препаровальные иглы в ходе работы обеззараживаются прокаливанием над пламенем горелки, предметные стекла и пипетки после работы помещаются в кастрюльку с дезинфицирующим раствором;
6. В лаборатории категорически запрещается применять пищу;
7. Не допускаются лишние хождения, резкие движения, посторонние разговоры (особенно во время посева микроорганизмов);
8. Категорически запрещается выносить микробные культуры за пределы лаборатории;
9. По окончании работы рабочее место необходимо привести в порядок, а лотки тщательно помыть с порошком или пемоксолью до бесцветной смывной воды.

Устройство микроскопа и правила работы с ним

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

Устройство микроскопа

Схема светового биологического микроскопа представлена на рис. 1. *Механическая часть* или штатив состоит из ножки, основания, тубусодержателя, предметного столика, монокулярной насадки (тубуса), револьверного устройства, рукоятки грубой фокусировки (макрометрического винта), рукоятки тонкой фокусировки (микрометрического винта).

Тубус – зрительная труба микроскопа. В верхнее отверстие тубуса свободно вставляется окуляр, на нижнем конце тубуса находится вращающееся вокруг своей оси револьверное устройство (револьвер), в которое ввинчиваются объективы. Вращая револьвер, можно быстро сменить объективы во время работы с микроскопом, подводя любой объектив под тубус. Объектив должен быть центрирован, т.е. установлен на оптическую ось микроскопа. Для этого револьвер поворачивают вокруг своей оси до появления щелчка. Предметный столик служит для размещения на нем изучаемого препарата. Препарат закрепляют на столике зажимами (клеммами). В центре предметного столика находится отверстие для прохождения лучей света и освещения препарата. В некоторых конструкциях микроскопа предметный столик может передвигаться с помощью винтов, расположенных по периферии предметного столика. Это дает возможность рассмотреть препарат в различных полях зрения.

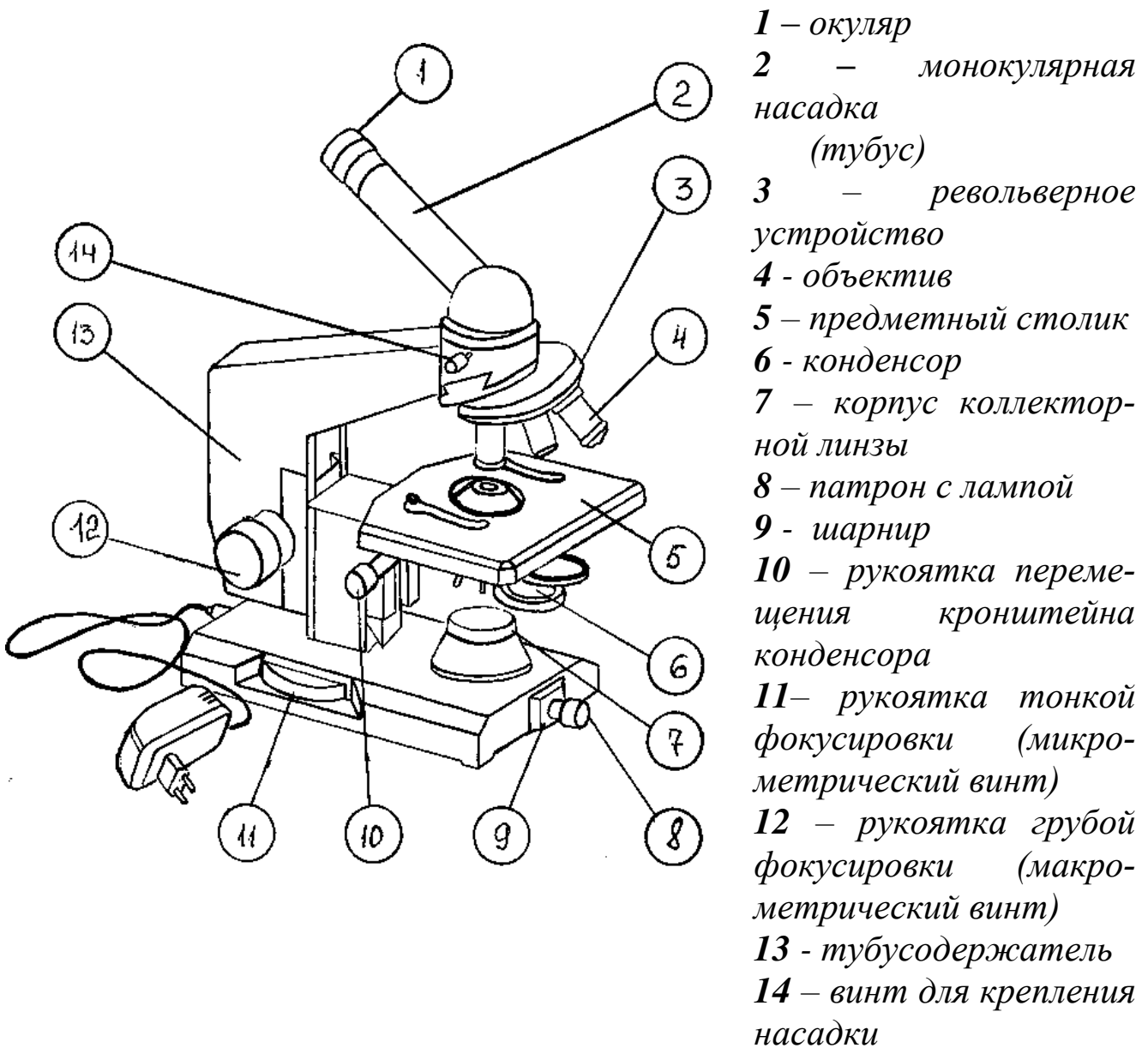


Рис. 1 *Схема устройства светового биологического микроскопа*
 Рукоятки грубой и тонкой фокусировки (макро- и микровинты) служат для перемещения тубуса вверх и вниз, что позволяет установить его на необходимом расстоянии от препарата. При вращении винтов по часовой стрелке тубус опускается, а при вращении против часовой стрелки – поднимается. При вращении макрометрического винта объектив ориентировочно устанавливается на фокус, т.е. на то расстояние от препарата, при котором он делается видимым. Оборот макровинта позволяет переместить тубус на 20

мм. Микрометрический винт служит для точной установки на фокус. Полный оборот его перемещает тубус на 0,1 мм. С микровинтом следует обращаться очень осторожно: допустимо вращение микровинта не более чем на 180° в ту или иную сторону.

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

Окуляр (от лат. *oculus* – глаз) состоит из двух плосковыпуклых линз, заключенных в общую металлическую оправу. Верхняя линза – глазная (увеличивающая), нижняя – собирающая. Расстояние между линзами равно полусумме их фокусного расстояния. У окуляров с большим увеличением фокус короче, поэтому меньше и длина окуляра. Между линзами имеется диафрагма, ограничивающая поле зрения и задерживающая краевые лучи света. Отечественные микроскопы снабжены тремя сменными окулярами, увеличение которых указано на корпусе окуляра (x7; x10; x15).

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

В гнезда револьверного устройства ввинчиваются четыре объектива, увеличение которых указано на корпусе объектива (x8; x20; x40; x90 или 100). Каждый объектив характеризуется своим фокусным расстоянием (расстоянием между предметным стеклом и фронтальной линзой): объектив x8 имеет фокусное расстояние около 9 мм, объектив x40 – 0,65 мм, объектив x90 – 0,15 мм.

Объективы подразделяются на *сухие* и *иммерсионные*.

При работе с *сухими объективами* (x8, x20, x40) между фронтальной линзой и препаратом находится воздух. В этом случае лучи света проходят среды с различными показателями преломления (покровное стекло, воздух), часть их отклоняется и не попадает в объектив.

При работе с *иммерсионными объективами* (x90 или x100) для устранения светорассеяния расстояние между фронтальной линзой объектива и препаратом заполняют иммерсионным (кедровым)

маслом, показатель преломления лучей света, которого близок к показателю преломления лучей света, проходящего через стекло.

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

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

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

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

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

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

Правила работы с микроскопом

1. На рабочем столе микроскоп ставят тубусодержателем к себе на расстоянии 3...5 см от края стола;
2. Включают микроскоп в сеть и устанавливают правильное освещение;

3. На предметный столик помещают исследуемый препарат и закрепляют его клеммами;
4. Под тубус помещают нужный объектив и с помощью макро и микровинтов устанавливают фокусное расстояние. Так, при работе с иммерсионными объективами на препарат предварительно наносят каплю иммерсионного масла и осторожно опускают тубусодержатель макровинтом до соприкосновения со стеклом. Затем, внимательно смотря в окуляр, очень медленно поднимают тубусодержатель, вращая его против часовой стрелки, до тех пор, пока не увидят изображение. Точную наводку объектива на фокус производят микрометрическим винтом. При работе с сухими объективами препарат вначале рассматривают с объективом $\times 8$. Поднимая с помощью макровинта тубусодержатель и внимательно смотря в окуляр, устанавливают фокусное расстояние (около 9 мм) и добиваются четкости изображения, используя микрометрический винт. Далее, двигая предметный столик или предметное стекло, устанавливают в центр поля тот участок препарата, в котором лучше всего виден изучаемый объект. Затем, вращая револьверное устройство вокруг своей оси, под тубус помещают объектив на $\times 20$ или $\times 40$. При этом под тубус не должен попасть объектив $\times 90$. В револьверном устройстве объективы располагаются таким образом, что если найдено изображение с объективом $\times 8$, то при рассмотрении препарата с объективами большего увеличения нужно слегка подрегулировать четкость изображения с помощью макро- и микрометрических винтов;
5. Во время микроскопирования необходимо держать оба глаза открытыми и пользоваться ими попеременно;
6. После окончания работы следует убрать препарат с предметного столика, опустить вниз конденсор, поставить под тубус объектив $\times 8$, удалить мягкой тканью или марлей, смоченной в спирте, иммерсионное масло с фронтальной линзы объектива $\times 90$, под объектив положить марлевую салфетку, опустить тубусодержатель.

2 Виды микроскопии

Основными характеристиками микроскопа являются *общее увеличение* и *разрешающая способность*. Общее увеличение не характеризует качества изображения, которое может быть четким и нечетким. Четкость получаемого изображения определяется *разрешающей способностью* микроскопа, т.е. той наименьшей величиной объектов или их деталей, которые можно увидеть с помощью этого прибора. Разрешающая способность зависит от длины проходящего через объект света, показателя преломления оптической среды (показатель преломления воздуха равен 1,0; иммерсионного масла – 1,516; стекла – 1,520) и апертурного угла объектива. Эту зависимость вывел немецкий физик Эрнст Аббе во второй половине XIX века: $d = \lambda / 2 n \sin \alpha$, где: d – минимальное расстояние между двумя точками, видимыми отдельно; λ – длина волны света, проходящего через исследуемый объект; $n \sin \alpha$ – числовая апертура, где n – показатель преломления светом оптической среды, α – апертурный угол объектива.

На рис.2 представлена схема, иллюстрирующая понятие апертурного угла микроскопа (стрелками обозначен ход световых лучей).

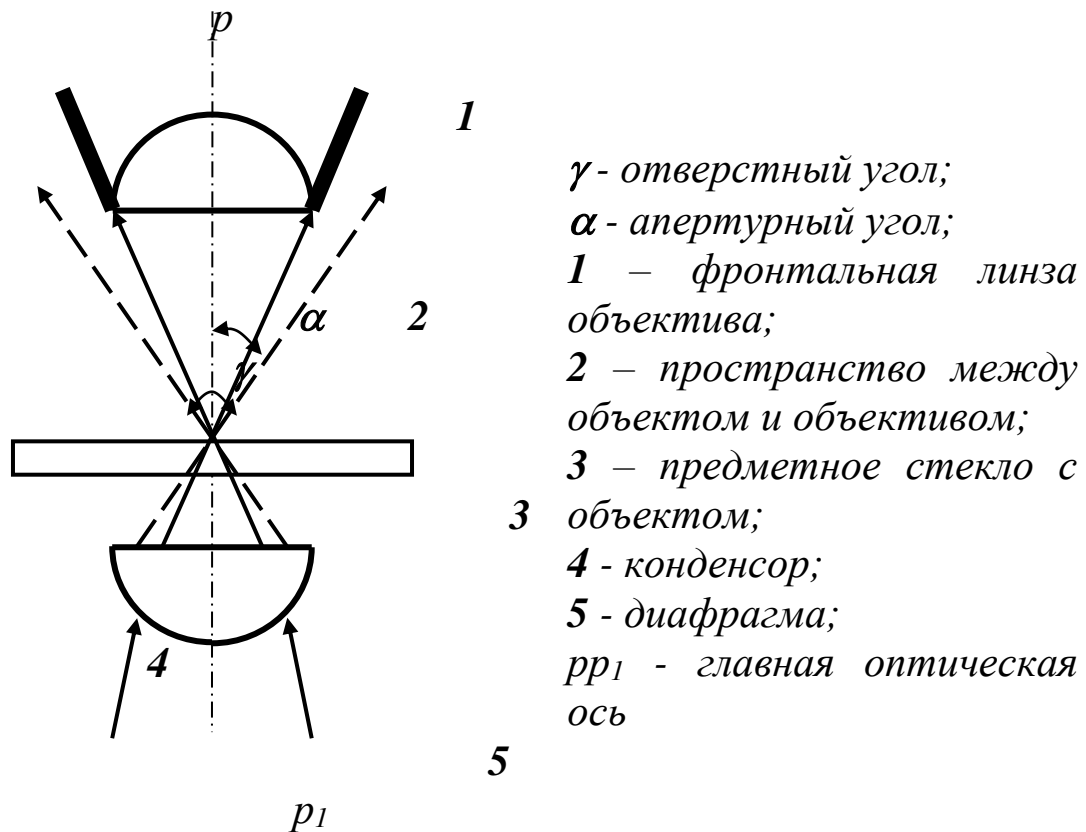


Рис. 2 Схема, иллюстрирующая понятие апертурного угла

Э. Аббе доказал, что нет смысла беспредельно повышать увеличение светового микроскопа. Минимальное расстояние между двумя точками при освещении объекта светом с длиной волны 550 нм, к которому наиболее чувствителен глаз, при использовании микроскопа, апертурный угол которого 90^0 (это предельный угол для которого $\sin\alpha=1$), для сухой системы составляет около 300 нм, а для иммерсионной системы – около 200 нм.

Таким образом, повысить разрешающую способность микроскопа можно путем:

- снижения длины волны света, проходящего через объект;
- использования иммерсионной системы;
- повышения апертурного угла до предельного (до 90^0).

Микроскопия в темном поле

Используется для исследования слишком малых и слабоконтрастных живых объектов. При микроскопии этим методом используют специальный конденсор темного поля, центр которого затемнен. Поэтому центральный пучок световых лучей не попадает в объектив и поле зрения микроскопа остается темным. Объект освещается только лучами, попадающими на него под углом. Рассеиваясь на объекте, часть лучей изменяет направление и попадает на объектив. Объект становится видимым как светящаяся точка на темном фоне. Метод темного поля позволяет получить представление о внешней форме живых неокрашенных объектов и их движении.

Микроскопия в темном поле позволяет увеличить разрешающую способность объектива примерно в 10 раз и рассматривать объекты, размеры которых находятся за пределами обычного микроскопа. *Повышение разрешающей способности достигается за счет увеличения апертурного угла.*

Фазово-контрастная микроскопия

Дает возможность изучать живые объекты без окраски и фиксирования. Глаз человека реагирует на изменения амплитуды световой волны (интенсивность, контрастность) и ее длины (цвет), но не воспринимает различий по фазе. В биологических препаратах чередуются места, которые в разной степени поглощают свет. Проходя через них, световые волны изменяют свою амплитуду. Такие участки объекта называют амплитудными, и под микроскопом они выглядят более темными. Прозрачные в видимом свете структур-

ные элементы объектов пропускают лучи одинаковой длины и амплитуды, но смещают их фазу. Величина смещения зависит от толщины и показателя преломления структур, но видимых изменений практически не дает. Такие препараты являются неконтрастными.

С помощью фазово-контрастного устройства фазовые изменения световых волн, проходящих через прозрачные объекты, превращаются в амплитудные, благодаря чему детали рассматриваемых объектов становятся видимыми и контрастными.

Фазово-контрастное устройство дает возможность изучать структуры клеток: жгутики и оболочки бактерий, ядра и митохондрии дрожжей и грибов.

Таким образом, *хотя разрешающая способность при использовании фазово-контрастной микроскопии не меняется при сравнении со светопольной, качество изображения улучшается за счет повышения контрастности.*

Люминесцентная микроскопия

Люминесцентная микроскопия позволяет изучать клетки в живом виде, выявлять мембранные структуры и получать высококонтрастные цветные изображения микроорганизмов.

Сущность явления люминесценции заключается в том, что некоторые молекулы структурных элементов клетки (пигменты, витамины, алкалоиды и др.) способны поглощать часть энергии падающего света определенной длины волны, переходить в электронно-возбужденное состояние и испускать свет с другой длиной волны. Источником возбуждения могут быть ультрафиолетовые лучи (300-400 нм) и видимый свет коротковолновой области спектра (400-460 нм).

Клетки микроорганизмов обладают слабой собственной (первичной) люминесценцией. Ее можно усилить предварительным окрашиванием препаратов нетоксическими красителями – флуорохромами (акридин оранжевый, нейтральный красный, аурамин, флуоресцин и др.). В результате возникает вторичная люминесценция. Для ее возбуждения достаточно использовать сине-фиолетовую часть спектра. В результате возникает высококонтрастное цветное изображение рассматриваемого объекта.

Таким образом, *при использовании люминесцентной микроскопии разрешающая способность микроскопа возрастает по сравнению со светопольной микроскопией за счет уменьшения длины волны проходящего через объект света.*

Электронная микроскопия

Максимальная разрешающая способность оптических микроскопов составляет около 0,2 мкм и зависит от длины волны используемых лучей света. *Увеличить разрешение в 100 и более раз можно, если вместо световых или ультрафиолетовых лучей применять поток движущихся электронов, обладающих волновыми свойствами (длина волны около 0,04 нм).*

Поток электронов движется в безвоздушном пространстве от источника электронов (раскаленная нить вольфрамовой пушки) по направлению к флуоресцентному экрану и вызывает равномерное свечение его. Если же на пути электронов поместить какой-либо объект, то в зависимости от его плотности электроны будут больше или меньше задерживаться, а соответствующие места на экране окажутся более или менее затемненными. Этот простой принцип работы современного электронного микроскопа дополнен принципом отклонения электронных лучей в магнитном поле подобно тому, как световые лучи отклоняются увеличивающими стеклянными линзами. При этом используются электромагнитные линзы.

Высокая разрешающая способность современных электронных микроскопов позволяет наблюдать и изучать объекты, невидимые в оптических микроскопах: вирусы и фаги, микоплазмы, строение клеток прокариотов и эукариотов, их макро- и микроструктурные элементы. Препараты для электронной микроскопии готовят в виде очень тонких срезов на специальных ультрамикротоммах или на тончайших пленках – подложках из коллодия. Следовательно, в электронных микроскопах микроорганизмы исследуют не в живом состоянии, а в виде фиксированных препаратов.

Ход работы

На занятии студенты знакомятся с устройством микроскопа и правилами работы с ним, видами микроскопии, основными особенностями их устройства и принципами их работы. Затем они осваива-

ют технику микроскопирования с использованием готовых препаратов.

Задание 1. *Изучить устройство микроскопа и правила работы с ним.*

Задание 2. *Зарисовать в тетрадь картину, увиденную под микроскопом.*

Оформление и анализ результатов исследований

В отчете студенты должны кратко законспектировать теоретических материал. Наблюдаемые под микроскопом картины нужно зарисовать. Под рисунками необходимо указать увеличение и подписать название изучаемого объекта.

Контрольные вопросы

1. Каково устройство биологического микроскопа?
2. Из каких частей и механизмов состоит механическая часть микроскопа?
3. Назовите основные характеристики микроскопа.
4. Что понимают под разрешающей способностью микроскопа? Как она определяется?
5. Что составляет оптическую систему микроскопа?
6. Объективы бывают сухие и иммерсионные. Что это значит?
7. Как определяется общее увеличение микроскопа?
8. Что входит в состав осветительной системы микроскопа?
9. Как следует настроить осветительную систему при работе с иммерсионным объективом?
10. Какие существуют правила работы с микроскопом?
11. Какие особенности устройства и принципы работы темнопольного, фазово-контрастного, люминесцентного и электронного микроскопов?
12. Чем определяется четкость получаемого изображения?

Лабораторная работа №2

Методы окраски бактерий. Приготовление и микроскопирование фиксированных окрашенных препаратов. Морфология бактерий.

Цель работы: Приобрести навыки по приготовлению фиксированных препаратов бактерий и освоить технику окраски препаратов бактерий простыми методами.

Оборудование, материалы: Микроскоп; бактериологические петли; предметные стекла; спиртовка; иммерсионное масло; фильтровальная бумага; краска Муромцева; фуксин; лоток с рельсами; промывалка; кефир; чистые культуры бактерий: *Staphylococcus albus*; 96 %-ный этиловый спирт.

Осваивают технику отбора чистых культур микроорганизмов и методику приготовления фиксированных препаратов бактерий. Готовят фиксированные препараты из чистых культур (*Staphylococcus albus*, *Sarsina flava*) и естественных мест обитания (кефира). Далее окрашивают эти препараты простыми методами (чистые культуры – фуксином, а кефир – краской Муромцева) и рассматривают их с использованием иммерсионной системы с объективом х90 или х100 при максимальном освещении.

Задание 1. Техника отбора чистых культур микроорганизмов

Отбор проб чистых культур бактерий и дрожжей, которые вырастают на поверхности плотной среды в виде мазеообразного налета или в жидкой среде ведут в следующей последовательности:

1. Зажигают спиртовку.
2. Пробирку с культурой помещают в левую руку между большим и указательным пальцами в наклонном положении. Поверхность с налетом микроорганизмов должна быть обращена вверх и хорошо видна.
3. Петлю держат вертикально в пламени горелки и прокаливают докрасна, затем наклоняют и обжигают примыкающую к ней часть петледержателя.
4. Мизинцем и безымянным пальцем правой руки прижимают к ладони наружную часть ватной пробки, вынимают ее из пробирки и держа в таком положении, не касаясь окружающих предметов.
5. Края открытой пробки обжигают в пламени горелки.
6. Осторожно вводят стерильную петлю в пробирку с культурой и охлаждают ее о стенки пробирки или прикоснувшись к питательной среде, свободной от микроорганизмов. Немного от-

странив пробирку с культурой от пламени горелки, легким движением осторожно отбирают небольшое количество микробной массы с поверхности среды или каплю жидкости с клетками. Вынимая петлю из пробирки, следят за тем, чтобы отобранный материал не касался стенок и петля не оказалась над пламенем горелки.

7. Снова обжигают в пламени горелки край пробирки, затем, легким круговым движением, обжигают ватно-марлевую пробку и закрывают пробирку.
8. Пробирку с культурой ставят в штатив, а извлеченный материал используют для приготовления препарата.
9. Клетки микроорганизмов, оставшиеся на петле, сжигают в пламени горелки.

Отбор чистых культур микроскопических грибов ведут с использованием препаровальной иглы в той же последовательности, что и отбор одноклеточных организмов. Из пробирки отбирают кусочек мицелия, слегка погружая иглу в питательную среду таким образом, чтобы не нарушить структуру мицелия.

Задание 2. Приготовление препаратов фиксированных клеток

Фиксированными считают клетки микроорганизмов, в которых прерваны жизненные процессы, но полностью сохранена тонкая структура.

Для получения фиксированных препаратов важно правильно подготовить предметные стекла. Они должны быть чистыми и тщательно обезжиренными. Для этого стекла, бывшие в употреблении, выдерживают 1-2 часа в хромовой смеси (в 1 л воды вносят 50 г бихромата калия и 100 г технической серной кислоты), после чего ополаскивают теплой водой и спиртом. Можно также кипятить стекла в течение 15 мин. в растворе соды или мыльной воды. Для проверки чистоты стекла на его поверхность наносят каплю воды. При достаточном обезжиривании капля растекается равномерно и не собирается в выпуклые, медленно высыхающие пузырьки. Берут стекла пинцетом или аккуратно за грани, так как пальцы оставляют на поверхности жирные пятна.

Приготовление фиксированных препаратов ведут в следующей последовательности:

1. На середину чистого обезжиренного предметного стекла стерильной петлей наносят небольшую каплю воды. В нее вносят исследуемый материал, отобранный по методике. Полученную суспензию равномерно распределяют по поверхности стекла тонким слоем таким образом, чтобы препарат распределился на площади примерно 2...3 см².
2. Полученный мазок высушивают при комнатной температуре на воздухе.
3. Производят фиксацию мазка. Для этого стекло с высохшим мазком проводят 3-4 раза над пламенем горелки той стороной, где мазок отсутствует. Цель фиксации:
 - умертвить клетки микроорганизмов и сделать их безопасными (что особенно важно при работе с патогенными микроорганизмами);
 - зафиксировать (закрепить) мазок на стекле (чтобы они не смывались при окрашивании);
 - улучшить окрашивание, поскольку мертвые клетки лучше адсорбируют на своей поверхности различные красители.

Приготовление фиксированных препаратов из естественных мест обитания микроорганизмов проводится так же, как и из чистых культур.

Помимо термической обработки, применяют также фиксацию химическими веществами: погружают предметное стекло с мазком в мензурку с 96 %-ным этанолом на 15-20 мин, с ацетоном на 5 мин, со смесью 96 % -ного этанола и 40%-ного формалина (соотношение 95:5) на 2 мин. и др.

Задание 3. Окраска фиксированных препаратов микроорганизмов простыми методами

Фиксированные препараты нельзя рассмотреть под микроскопом, так как они являются бесцветными и пропускают световые лучи. Поэтому их окрашивают, используя простые или сложные методы. При окрашивании фиксированных мазков простыми методами используют один краситель (фуксин, краска Муромцева, генцианвиолет, метиленовая синь и др.).

Последовательность окрашивания мазка простыми методами, следующая:

1. На фиксированный препарат наносят несколько капель красителя таким образом, чтобы он покрывал всю поверхность мазка и выдерживают в течение определенного времени. Так, при окраске фуксином на мазок наносят несколько капель красителя и выдерживают его на мазке 2...3 мин. При окрашивании препарата из кефира на него краску Муромцева наносят на мазок через полоску фильтровальной бумаги на 3...5 мин.
2. Краску смывают с мазка слабой струей до бесцветной смывной воды. При этом стекло держат в наклонном положении над лотком.
3. Мазок подсушивают фильтровальной бумагой, которую осторожно прикладывают к стеклу, и досушивают на воздухе.
4. На окрашенный мазок наносят каплю иммерсионного масла и рассматривают препарат с объективом x90 или x100.

Задание 4. *Окраска бактерий по методу Грама*

Сущность метода заключается в различии химического состава и строения клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Клеточная стенка грам+ бактерий толстая, но однослойная, содержит много пептидогликана – муреина, а также тейховые кислоты, которые образуют прочное соединение с красителями - генцианвиолетом и йодом и поэтому остаются окрашенными после обработки мазка спиртом. Таким образом, грам+ бактерии по методу Грама окрашиваются в сине-фиолетовый цвет.

У грам - бактерий клеточная стенка тонкая, но двухслойная. Муреина мало, причем он содержится во внутреннем слое клеточной стенки, тейхоевые кислоты отсутствуют. Внешний слой клеточной стенки содержит, главным образом, вещества, обладающие гидрофобными свойствами – липополисахариды и липопротеиды. Эти вещества не образуют прочного комплекса с красками генцианвиолетом и йодом и поэтому клетки обесцвечиваются после обработки 96 %-ным этиловым спиртом и после дополнительной окраски красителем фуксином окрашиваются в бледно-розовый цвет.

Техника окраски по Граму

1. На предметном стекле готовят фиксированный мазок исследуемой чистой культуры;
 2. Мазок окрашивают красителем генцианвиолетом через полоску фильтровальной бумаги. Можно также использовать заранее приготовленные фильтровальные бумажки, смоченные 1 %-ным спиртовым раствором кристаллвиолета и высушенные (метод Грама в модификации А.В. Синева). В этом случае бумажки помещают на фиксированный мазок и смачивают несколькими каплями воды. Окраску препарата проводят в течение 2...3 мин;
 3. Фильтровальную бумагу снимают с мазка, краску сливают и наносят на мазок раствор Люголя на 2 мин;
 4. Раствор Люголя сливают с мазка и обрабатывают 96 %-ным спиртом в течение 30...60 сек. Затем препарат промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой;
 5. Мазок окрашивают красителем фуксином 2...3 мин, второй раз промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой.
- Затем на стекло наносят каплю иммерсионного масла и рассматривают препарат с объективом х90 или х100 при максимальном освещении.

Оформление и анализ результатов исследований

В отчете студенты должны кратко законспектировать теоретических материал. Наблюдаемые под микроскопом картины нужно зарисовать и сделать заключение о морфологии исследованных чистых культур, а также микрофлоры кефира. Под рисунками необходимо указать увеличение и подписать название изучаемого объекта.

Контрольные вопросы

1. Как проводится отбор проб чистой культуры микроорганизма?
2. Перечислите основные этапы приготовления фиксированного окрашенного препарата.
3. Техника проведения окраски по Граму.

Лабораторная работа №3

**Морфология мицелиальных грибов и дрожжей.
Приготовление и изучение препаратов из живых микроорганизмов.**

Цель работы: Ознакомиться с морфологическими особенностями грибов и дрожжей, встречающихся при производстве пищевых продуктов. Освоить технику микроскопического исследования грибов и дрожжей в препаратах «раздавленная капля».

Оборудование, материалы: Микроскоп; препаровальные иглы и бактериологические петли; предметные и покровные стекла; фильтровальная бумага; спиртовка; лоток с рельсами для предметных стекол; культуры грибов родов *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*; чистая культура дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Краткие теоретические положения

Морфология и культуральные признаки микроскопических грибов

Микроскопические грибы относятся к надцарству эукариот, царству грибов, отделу истинных грибов и являются представителями трех из четырех классов: фикомицетов, аскомицетов и дейтеромицетов. Представители царства грибов являются аэробными микроорганизмами и по типу питания относятся к хемоорганогетотрофам. Большинство грибов – сапрофиты, но некоторые вызывают заболевания и являются паразитами.

Вегетативное тело грибов называется мицелием. Мицелий состоит из множества переплетающихся нитей-трубочек, называемых *гифами*. Диаметр гифов, колеблется от 5 до 50 мкм. В зависимости от строения мицелия грибы делятся на высшие и низшие. У высших грибов гифы разделены перегородками (септами) в центре которых имеется большая пора. В класс фикомицетов объединяются низшие грибы, представители классов аскомицетов и дейтеромицетов являются высшими грибами.

Грибы – это *циноцитные* микроорганизмы. Это значит, что они растут и при этом происходят деления ядер, но не происходит клеточных делений. Таким образом, вегетативное тело гриба представляет собой одну большую многоядерную клетку.

Все микроскопические грибы могут размножаться вегетативно кусочком мицелия.

При бесполом размножении у фикомицетов образуются *спорангиеносцы*, а у аскомицетов – *конидиеносцы*. Дейтеромицеты могут размножаться *многоклеточными конидиями*.

Фикомицеты и аскомицеты являются *совершенными грибами*. Это значит, что представители этих классов могут размножаться половым путем. Дейтеромицеты относятся к *несовершенным грибам*.

Культуральные признаки микроскопических грибов

Колонии микроскопических грибов по размерам во много раз превосходят колонии одноклеточных организмов (бактерий, грибов) и нередко разрастаются по всей поверхности питательной среды в чашках Петри. Консистенция грибных колоний различная. Чаще образуются войлокообразные и кожистые колонии, реже крошковатые. Поверхность колоний может быть пушистой, как вата, бархатистой, мучнистой, паутинообразной, нитевидной, кожистой или гладкой. При росте на плотных и жидких средах часть гифов врастает в питательную среду, образуя *субстратный* мицелий, а другая часть гифов образует *воздушный* мицелий в виде пушистого налета, видимого невооруженным глазом. Мицелий может быть также бесцветным (белым, сероватым) или окрашенным (черным, бурым, зеленым, желтым и т.д.). Пигментирован только плодоносящий мицелий.

Характеристика микроскопических грибов различных классов

Род *Mucor* относится к классу фикомицетов. Эти грибы имеют несептированный мицелий. Они могут размножаться бесполом и половым путем с образованием спорангиеносцев (рис. 5). Снаружи спорангий покрыт тонкими шипами из кристаллов щавелевокислого кальция. При созревании спорангий разрывается, спорангиеспоры высвобождаются и разносятся воздушными потоками. На спорангиеносце после освобождения спорангия от спор остается колонка, а в нижней ее части – воротник. Цвет мицелия мукоровых грибов вначале белый, затем серовато-оливковый, вид – войлокоподобный.

Мукоровые грибы растут на поверхности влажного зерна, солода, корнеплодов, на пищевых продуктах, на стенах сырых помещений в виде сероватого пушистого налета. *Mucor nigricans* является возбудителем кагатной гнили сахарной свеклы. Многие мукоровые грибы используются в промышленности для производства различных органических кислот и спирта (грибы видов *Mucor javanicus*, *Mucor racemosus*), ферментных препаратов, каротиноидов, стероидов.

Представители родов *Aspergillus* и *Penicillium* относятся к классу аскомицетов, который объединяет высшие микроскопические совершенные грибы. При бесполом размножении с помощью спор эти грибы образуют конидиеносцы (рис. 5). Аспергиллы и пенициллы относятся к плодосумчатым грибам. Это значит что при половом размножении у них на специальных плодовых телах образуются аски (сумки), в которых находятся 8 аскоспор.

К роду *Penicillium* относится около половины всех плесневых грибов. Они широко распространены в почве, в воздухе плохо проветриваемых помещений и вызывают порчу различных продуктов и материалов. Этот гриб имеет ветвящийся септированный мицелий (диаметр гифов – 2...3 мкм) и септированные конидиеносцы (напоминают кисточки), которые на конце разветвляются в виде отростков – стеригм. От них отходят конидии, состоящие из цепочек спор. В зависимости от вида конидии могут быть разного цвета (белые, зеленые и др.). Многие пенициллы используются в промышленности для получения различных ценных продуктов. Среди выделенных штаммов этого рода 25 % обладают антибиотической активностью, а такие виды как *Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum* используются как продуценты пенициллина. Некоторые виды пенициллов используются как продуценты ферментов и липидов. В производстве мягких сыров рокфор и камамбер используются благородные плесени *Penicillium roqueforti* и *Penicillium camamberti*.

Грибы рода *Aspergillus* насчитывают более 200 видов. Эти грибы имеют хорошо развитый ветвящийся мицелий с многочисленными септами. Конидиеносцы несептированы,

верхние их концы грушевидно или шаровидно расширены в виде небольшой головки. На головке располагаются кеглеобразные стеригмы с цепочками конидий, которые напоминают струйки воды, выливающиеся из лейки. Отсюда возникло название «лещная плесень» (*aspergere* по латыни – поливать, опрыскивать). Конидии аспергиллов при созревании приобретают различную окраску, что наряду с другими признаками определяет их видовую принадлежность.

Так же как и пенициллы, представители рода *Aspergillus* широко распространены в природе и играют важную роль в минерализации органических веществ. Они вызывают плесневение многих пищевых продуктов. Эти грибы являются продуцентами многих ценных веществ и широко используются в промышленности. Так, *Aspergillus niger*, применяют в промышленности для производства лимонной кислоты; *Aspergillus terreus* – итаконовой кислоты *Aspergillus flavus* и *Aspergillus terricola* образуют наиболее активный комплекс протеолитических ферментов; *Aspergillus oryzae* и *Aspergillus awamori* являются лучшими продуцентами амилолитических ферментов.

Грибы рода *Alternaria* относятся к классу несовершенных грибов – дейтеромицетов. Это высшие грибы. Они имеют септированный мицелий и короткие несептированные конидиеносцы, на которых находятся многоклеточные конидии грушевидной или лимоновидной формы. Гриб является возбудителем черной гнили – болезни корнеплодов и плодов, а также возбудителем порчи пищевых продуктов.

Морфология дрожжей и их характеристика

Дрожжи – это высшие одноклеточные грибы. Большинство дрожжей относится к двум классам грибов – аскомицетам и дейтеромицетам.

Дрожжи по отношению к кислороду делятся на факультативные анаэробы (в аэробных условиях осуществляют дыхание и активно накапливают биомассу, а в анаэробных условиях вызывают спиртовое брожение) и аэробы.

Морфологически дрожжи разнообразны. Они отличаются друг от друга размерами и формой клеток. Размеры клеток

дрожжей в зависимости от вида варьируют в следующих пределах; от 2,5 до 10 мкм в поперечнике и от 4 до 20 мкм в длину.

Форма и размеры дрожжевых клеток зависят от вида, возраста, питательной среды, способа культивирования.

В зависимости от вида дрожжи вегетативно могут размножаться почкованием (так размножаются дрожжи овальной формы), бинарным делением (характерно для дрожжей цилиндрической или палочковидной формы) или почкующимся делением. Кроме вегетативного размножения, дрожжи – аскомицеты могут размножаться половым путем с образованием аскоспор.

Из дрожжей, относящихся к классу аскомицетов, большое значение имеют дрожжи-сахаромицеты рода *Saccharomyces*, которые широко используются в пищевой промышленности. Главным биохимическим признаком этих дрожжей является то, что они сбраживают сахара с образованием этилового спирта и диоксида углерода. Дрожжи, используемые в промышленности, называются *культурными дрожжами*. Так, в хлебопекарном производстве и в производстве спирта используются верховые дрожжи рода *Saccharomyces cerevisiae*. Дрожжи вида *Saccharomyces minor* нашли применение в производстве ржаного хлеба и кваса. В пивоварении используются низовые дрожжи *Saccharomyces carlsbergensis*. Дрожжи-сахаромицеты имеют овальную форму, вегетативно размножаются почкованием, в неблагоприятных условиях размножаются половым путем аскоспорами.

Некоторые спорогенные дрожжи являются *дикими дрожжами*. Эти дрожжи так же, как и культурные, способны осуществлять спиртовое брожение, но помимо спирта образуют много побочных продуктов (таких как альдегиды, высшие спирты, эфиры и др.) и поэтому ухудшают органолептические показатели продукта. Эти дрожжи являются вредителями производства различных напитков (пива, вина, безалкогольных напитков), а также возбудителями порчи многих пищевых продуктов.

Дрожжи - дейтеромицеты могут размножаться только вегетативным способом. Некоторые из этих дрожжей (например, дрожжи рода *Candida*) используются в промышленности для получения кормового белка, органических кислот, витаминов и других продуктов микробного синтеза. Дрожжи вида *Torulopsis kefir* входят в состав симбиотической закваски – кефирного грибка. Другие представители несовершенных (аспорогенных) дрожжей являются дикими дрожжами и вызывают порчу многих пищевых продуктов. К дрожжам-вредителям производства относятся дрожжи родов *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Torula*, *Torulopsis*, *Mycoderma*, *Trichosporon* и др. Среди аспорогенных дрожжей встречаются *ложные дрожжи*, которые образуют псевдомицелий и растут на жидких субстратах в виде пленок.

Порядок выполнения работы

На занятии студенты изучают морфологические признаки грибов и дрожжей, их культуральные свойства, знакомятся с представителями отдельных классов. Осваивают методику приготовления препаратов «раздавленная капля» и технику микроскопирования живых неокрашенных объектов.

Задание 1. Приготовление препаратов типа «раздавленная капля»

1. На предметное стекло трубочкой или пипеткой наносят большую каплю воды или этилового спирта;
2. Зажигают спиртовку, прокаливают препаровальную иглу над пламенем горелки и отбирают небольшое количество мицелия из пробирки или чашки Петри, соблюдая правила асептики;
3. Мицелий аккуратно помещают в каплю, нанесенную на предметное стекло и с помощью двух игл расправляют его в воде;
4. Препарат накрывают покровным стеклом и слегка придавливают. Излишки воды удаляют с помощью фильтровальной бумаги.
5. Микроскопируют препарат «раздавленная капля» сначала с объективом х8, а затем х40 в затемненном поле зрения (конденсор опущен, шторка ирис-диафрагмы прикрыта).

При отборе и микроскопии препаратов грибов учитывают следующие рекомендации:

а) *гриб рода Mucor*. Отбирают черновато-серый пушистый воздушный мицелий. При микроскопии обращают внимание на гифы с заполненными спорами спорангиями и колонки, которые образуются при освобождении спорангия;

б) *гриб рода Aspergillus*. Отбирают немного пушистого мицелия с окрашенными конидиями, слегка углубляясь иглой в питательную среду. Обращают внимание на несептированные конидиеносцы;

в) *гриб рода Penicillium*. При отборе стараются взять молодой мицелий (на границе окрашенного и белого мицелия), углубляясь иглой в среду. Обращают внимание на септированные гифы с кисточками.

г) *гриб рода Alternaria*. Берут грибницу в черных участках, углубляясь в нее иглами. Обращают внимание на септированный мицелий, слабо развитые конидиеносцы и крупные конидии, имеющие вид округлых или заостренных многоклеточных образований, напоминающих «гранаты-лимонки».

При исследовании дрожжей на предметное стекло наносят суспензию дрожжей, накрывают покровным стеклом, излишки воды удаляют фильтровальной бумагой. Микроскопируют препарат и объективом х8 и х40.

Оформление и анализ результатов исследований

В отчете студенты кратко конспектируют теоретический материал. Зарисовывают микроскопические картины исследованных культур грибов и дрожжей с учетом морфологических особенностей каждого микроорганизма. Под каждым рисунком подписывают латинское название и увеличение препарата. Описывают культуральные свойства изучаемых грибов.

Контрольные вопросы

1. Как готовятся препараты микроскопических грибов и дрожжей?

2. *Охарактеризуйте морфологические и культуральные свойства микроскопических грибов.*
3. *Какие грибы используются в промышленности для получения органических кислот, ферментов, антибиотиков и других ценных продуктов?*
4. *Охарактеризуйте морфологические свойства дрожжей.*
5. *Что такое культурные дрожжи? В каких отраслях пищевой промышленности они используются?*

Лабораторная работа №4

Культивирование микроорганизмов. Типы питательных сред и их приготовление.

Цель работы: Ознакомиться с требованиями, предъявляемыми к питательным средам, с различными классификациями и химическим составом питательных сред, правилами их приготовления и целью использования. Освоить технику посева микроорганизмов на плотные и жидкие питательные среды. Приобрести навыки подготовки посуды для проведения микробиологических исследований.

Оборудование, материалы: Паровой стерилизатор; сушильный шкаф; посуда: чашки Петри; градуированные пипетки на 1 мл, пробирки, плоскодонные конические или круглодонные колбы разного объема; штатив для пробирок; ватно-марлевые пробки; пергаментная бумага; ножницы; вата, нитки, марля, агар-агар; сухие питательные среды: среда Сабуро, мясопептонный агар (МПА), среды Кесслера, Эндо и др.

Студенты знакомятся с принципами составления и классификацией питательных сред, методами стерилизации питательных сред, посуды, инвентаря, изучают устройство парового стерилизатора и принцип его работы и кратко конспектируют изложенный в теоретической части материал. Затем готовят посуду, питательные среды и ватно-марлевые пробки для проведения микробиологического анализа.

Теоретический материал.

Типы питательных сред и их приготовление (теоретический материал приведен в практическом занятии)

Понятие о чистой и накопительной культуре микроорганизмов

Культивирование – выращивание микроорганизмов на питательных средах. При культивировании на питательных средах вырастают *культуры* микроорганизмов. *Рост культуры* – физиологический процесс, в результате которого увеличивается *биомасса* – масса клеточного вещества данного микроорганизма.

Чистой культурой микроорганизма называют культуру микроорганизмов одного вида, представленную потомством одной клетки. Для выделения чистой культуры используют, как правило, плотные питательные среды, на которых каждая клетка вырастает в виде *изолированной колонии* – потомства микроорганизмов, образовавшееся из одной клетки.

Выделение чистой культуры микроба является основой бактериологической работы, так как чаще всего исследуемый материал содержит смесь различных видов микробов. Чистые культуры нужны для изучения свойств микроорганизмов и установления их видовой принадлежности. Кроме того, чистые культуры микроорганизмов (дрожжей, микроскопических грибов, молочнокислых, уксуснокислых, пропионово-кислых и других бактерий) обладают промышленно ценными свойствами и нужны для получения различных продуктов и веществ, нашедших применение в пищевой промышленности и других отраслях народного хозяйства.

Перед выделением чистой культуры из различных объектов окружающей среды (пищевого продукта, с поверхности плодов и овощей, из почвы, воды и др.), в которых находится множество микроорганизмов, вначале получают накопительные культуры, проводя культивирование в *элективных условиях* - условиях, способствующих развитию одной культуры и ограничивающих развитие сопутствующих микроорганизмов. Обеспечить элективные условия для микроорганизмов можно только в том случае, если известны особенности обмена веществ выделяемого микроорганизма. Так как различные мик-

роорганизмы используют различные источники питания, то элективные условия легче всего обеспечить, подбирая определенный состав питательных сред. Можно создать элективные условия, обеспечивая соответствующую температуру, рН, освещение и др.

Накопительные культуры состоят преимущественно из клеток микроорганизмов одного вида. Для получения накопительных культур используют жидкие накопительные питательные среды, различные методы обработки материала, содержащего смесь микробов, а также учитывают другие особенности выделяемых из объекта микроорганизмов.

Для выделения чистых и накопительных культур из различных объектов в лабораториях используют методы посева и пересева. *Посевом* называется внесение части исследуемого материала в стерильную питательную среду, *пересевом* – перенос части выросшей на питательной среде культуры микроорганизмов на другую свежую питательную среду.

Методы выделения накопительных культур микроорганизмов

К таким методам относятся методы обогащения, метод нагревания исследуемого материала для выделения спорообразующих бактерий, метод выделения подвижных форм бактерий (метод Шукевича) и др.

Методы обогащения

Их часто применяют для выделения чистых культур микроорганизмов (например, бактерий группы кишечной палочки (БГКП), сальмонелл и др.) из материалов, в которых мало выделяемых микроорганизмов, но содержится большое количество сопутствующей микрофлоры. Для увеличения численности выделяемого вида микроорганизмов вначале делают посев исследуемого материала в накопительные питательные среды, которые содержат вещества, стимулирующие его рост и угнетающие или задерживающие размножение сопутствующей микрофлоры. Например, для выделения сальмонелл проводят посев в среды обогащения Кауфмана, Мюллера и др., для выделения БГКП – на среду Кесслера. При выделении культур молочнокислых бактерий из почвы, сырого

молока или растений посева делают на стерильное обезжиренное молоко, содержащее 5 % этилового спирта для подавления роста гнилостных бактерий.

Метод нагревания

Применяют для выделения чистых культур споровых форм бактерий (бацилл, клостридий). В этом случае перед посевом исследуемый материал прогревают на водяной бане при температуре 75...85 °С в течение 20...30 мин. Вегетативные формы погибают во время прогревания, а споры микробов остаются живыми и при последующих посевах на плотную среду прорастают, формируя колонии.

Метод выделения подвижных форм бактерий (метод Шукевича)

Заключается в посеве исследуемого материала в конденсационную воду скошенного мясопептонного агара. При размножении подвижные формы микроорганизмов из конденсационной воды распространяются на агаре, как бы вползая на его поверхность.

Методы выделения анаэробных микроорганизмов

Основаны на выращивании микроорганизмов в средах с низкой концентрацией кислорода или в бескислородной среде, что достигается:

- посевом исследуемого материала в среды, содержащие редуцирующие и легко окисляемые вещества (антиоксиданты). В качестве таких веществ чаще всего используют тиогликолят натрия, солянокислый цистеин, кусочки животных и растительных тканей;
- посевом исследуемого материала в глубину плотных питательных сред. Посев делается уколом препаровальной иглой в пробирку со столбиком плотной среды или в расплавленную плотную или полужидкую питательную среду с последующим перемешиванием;
- механическим удалением воздуха из сосудов при выращивании анаэробных микроорганизмов (создают вакуум);
- культивированием анаэробных микроорганизмов в жидких средах под слоем масла;

- культивированием анаэробных микроорганизмов в атмосфере инертного газа, диоксида углерода, азота.

Методы выделения чистых культур микроорганизмов

Метод Пастера (метод предельных разведений)

Заключается в том, что из исследуемого материала делают ряд последовательных разведений в жидкой питательной среде. Для этого каплю посевного материала вносят в пробирку со стерильной жидкой средой, из нее каплю переносят в следующую пробирку и так засевают до 8...10 пробирок. С каждым разведением количество микробных клеток, попадающих в среду, будет уменьшаться и можно получить такое разведение, в котором во всей пробирке со средой будет находиться только одна микробная клетка, из которой разовьется чистая культура микроорганизма. Так как в жидких средах микробы растут диффузно, т.е. легко распределяются во всей среде, то изолировать одну микробную клетку от другой трудно. Таким образом, метод Пастера не всегда обеспечивает получение чистой культуры. Поэтому в настоящее время этот метод используется, главным образом, для предварительного уменьшения концентрации микроорганизмов в материале перед посевом его в плотную среду для получения изолированных колоний.

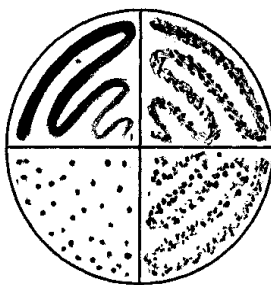
Методы механического разделения микроорганизмов с использованием плотных питательных сред

К таким методам относятся метод Коха и метод Дригальского. *Метод Коха (метод глубинного посева)*.

Исследуемый материал вносят бактериологической петлей или пастеровской пипеткой в пробирку с расплавленной плотной питательной средой. Равномерно размещивают содержимое пробирки, вращая ее между ладонями. Каплю разведенного материала переносят во вторую пробирку, из второй – в третью и т.д. Содержимое каждой пробирки, начиная с первой, выливают в стерильные чашки Петри. После застывания среды в чашках, их помещают в термостат для культивирования. Для выделения анаэробных микроорганизмов по методу Коха необходимо ограничить доступ кислорода к

культуре. С этой целью поверхность глубинного посева в чашке Петри заливают стерильной смесью парафина и вазелина (1:1). Можно также оставлять посевной материал, тщательно перемешанный с агаризованной средой, непосредственно в пробирке. Ватную пробку при этом заменяют резиновой или заливают поверхность агара смесью парафина и вазелинового масла. Чтобы извлечь выросшие колонии анаэробных микроорганизмов, пробирки слегка нагревают, быстро вращая над пламенем горелки. Агар, прилегающий к стенкам, расплавляется, и столбик легко выскользывает в подготовленную чашку Петри. Далее столбик с агаром разрезают стерильным скальпелем, колонии извлекают стерильной петлей или стерильной капиллярной рубкой и переносят в жидкую среду.

Метод Дригальского основан на механическом разделении микробных клеток на поверхности плотной питательной среды в чашках Петри. Каждая микробная клетка, фиксируясь в определенном месте, начинает размножаться, образуя колонию. Для посева по методу Дригальского используют несколько чашек Петри, залитых плотной питательной средой. На поверхность среды вносят каплю исследуемого материала. Затем с помощью стерильного шпателя эту каплю распределяют по всей питательной среде (посев газоном).



Посев также можно проводить штрихом, используя бактериологическую петлю. Этим же шпателем или петлей осуществляют посев во вторую, третью и т.д. чашки. Как правило, в первой чашке после культивирования посева появляется рост микробов в виде сплошного налета, в последующих чашках содержание микроорганизмов снижается и образуются изолированные колонии, из которых отсевом можно легко выделить чистую культуру.

Таким образом, в первых секторах получается сплошной рост, а вдоль последующих штрихов вырастут обособленные колонии, представляющие собой потомство одной клетки.

В целях экономии сред и посуды можно пользоваться одной чашкой, разделив ее на сектора, и последовательно засеивать их штрихом (*метод истощающего штриха*). Для этого материал берут петлей и проводят ею ряд параллельных штрихов сначала по поверхности первого сектора, а затем последовательно оставшимися на петле клетками засеивают все другие сектора. При каждом последующем штрихе происходит уменьшение количества засеиваемых клеток.

Метод выделения чистых культур с помощью химических веществ используется при изолировании культур микроорганизмов, устойчивых к определенным химическим веществам. Например, с помощью этого метода можно выделить чистую культуру туберкулезных микобактерий, устойчивых к действию кислот, щелочей и спирта. В этом случае исследуемый материал перед посевом заливают 15 % раствором кислоты или антиформинном и выдерживают в термостате в течение 3...4 часов. После воздействия кислоты или щелочи клетки туберкулезной палочки остаются живыми, а все другие микроорганизмы, содержащиеся в исследуемом материале, погибают. После нейтрализации кислоты или щелочи обработанный материал высеивают на плотную среду и получают изолированные колонии возбудителя туберкулеза.

Биологические методы выделения чистых культур патогенных микроорганизмов основаны на заражении исследуемым материалом лабораторных животных, восприимчивых к данному виду возбудителя. Если патогенный микроорганизм содержится в исследуемом объекте, то лабораторное животное заболевает и погибает. После вскрытия павшего животного из внутренних органов делают посевы на специальные среды, на которых вырастают чистые культуры выделяемых микробов.

Ход работы:

Задание1 **Приготовление посуды для проведения микробиологического анализа**

Для проведения микробиологического анализа используют чашки Петри, которые герметично упаковываются в пергаментную бумагу и стерилизуются. Пипетки на 1 см³ закрывают ватными тампонами и также заворачивают в бумагу. Колбы закрывают ватно-марлевыми пробками и сверху делают колпачки из пергаментной бумаги.

Стерилизация посуды осуществляется в автоклаве при избыточном давлении 0,1 МПа в течение 30-40 минут или сухим жаром в сушильном шкафу или печи Пастера при 165-170 °С в течение 1-1,5 часа.

Стерильную посуду следует хранить в плотно закрывающихся шкафах или ящиках с крышками в течение не более 30 суток.

Задание 2 Приготовление питательных сред из промышленно выпускаемых сухих сред

Заключается в растворении определенного количества порошка в воде, доведении полученной смеси до кипения и кипячении в течение 5 минут. Далее (при необходимости) среда фильтруется через ватно-марлевый фильтр и разливается в пробирки или колбы, которые закрываются ватно-марлевыми пробками. Далее среды стерилизуют в автоклаве. С использованием сухих сред готовят мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), среду Сабуро, среду Кесслера, среду для определения мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (среда для определения КМАФАнМ), среду Эндо и др.

Задание 3 Приготовление питательных сред.

Ход работы:

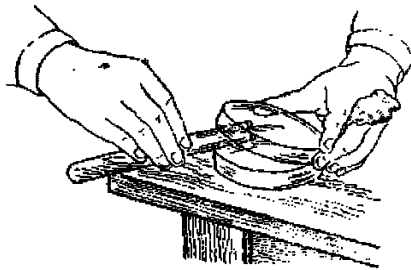
Мясопептонный бульон (МПБ)- жидкая питательная среда. Для его приготовления к 1 л мясной воды добавляют 1 % пептона, 0,5 % химически чистой поваренной соли и кипятят. Мясная вода имеет слабокислую реакцию, поэтому МПБ подщелачивают — добавляют небольшое количество 10—15%-го раствора КОН или NaOH, кипятят 2...3 мин, проверяют рН электропотенциометром. Мясопептонный бульон фильтруют через бумажный фильтр, разливают по пробиркам, автоклавируют.

Мясопептонный агар (МПА)- плотная питательная среда. К МПБ добавляют 2 % агар-агара (безазотистое органическое вещество, полученное из морских водорослей) и кипятят до его расплавления, в горячем виде определяют рН, кипятят еще 5... 10 мин, фильтруют в горячем виде через ватно-марлевый фильтр, разливают в пробирки или колбочки, автоклавируют. После стерилизации горячие пробирки с агаром укладывают наклонно под углом 5...6°С: при застывании образуется скошенная плотная поверхность. Для посева на агаровые пластинки его заливают в чашки Петри.

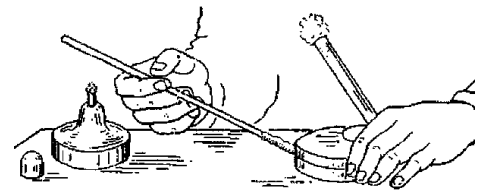
Задание 4 *Техника посева и пересева микроорганизмов на питательные среды*

Посевы и пересевы микроорганизмов на питательные среды проводят около пламени горелки (но не в пламени), по возможности быстро, чтобы не загрязнить культуры посторонними микроорганизмами. Нельзя делать резких движений, ходить, кашлять и т.п. около работающего с чистой культурой, так как движение воздуха увеличивает опасность случайного заражения культуры и среды. Поэтому посевы и пересевы микроорганизмов следует проводить в боксе.

Посев на плотные среды в чашки Петри



Правила разливания питательной среды в чашки Петри



Посев на агар в чашки Петри

Посев в чашки Петри производят следующим образом: плотную питательную среду в пробирках или колбах расплавляют на кипящей водяной бане, охлаждают до 48-50 °С и, со-

блюдая правила асептики, разливают ровным слоем толщиной 3 – 5 мм в стерильные чашки. Посев делают стеклянным шпателем (Дригальского) или петлей в виде параллельных или зигзагообразных (метод истощающего посева) штрихов.

Посев в жидкую питательную среду

Посев в жидкую среду можно производить бактериологической петлей или пипеткой вблизи пламени горелки. Обе пробирки держат в слегка наклонном положении, чтобы не замочить ватно-марлевые пробки. Петлю с микробным материалом опускают непосредственно в стерильную среду и ополаскивают. При внесении клеток, взятых петлей из плотной среды, материал тщательно растирают по стенке пробирки у верхнего края жидкой среды, все время смывая его средой.

Пересев на плотные питательные среды в пробирках

1. Пробирки с культурой и питательной средой помещают на два пальца левой руки в наклонном положении. В правой руке большим и указательным пальцем держат бактериальную петлю и стерилизуют в пламени горелки;
2. Вынимают ватные пробки из обеих пробирок, прижимают их к ладони мизинцем и безымянными пальцами правой руки и обжигают края пробирок. Следят за тем, чтобы пробки не касались посторонних предметов;
3. Петлю вводят в пробирку с пересеваемой микробной культурой. Осторожно, не касаясь стенок, отбирают каплю жидкой культуры. Если производят пересев с косога слоя агара, то для охлаждения петли вначале следует прикоснуться к поверхности агара, где нет культуры, после чего берут небольшое количество микробной массы со скошенной питательной среды;
4. Вводят петлю с материалом в пробирку со стерильной жидкой средой, стараясь не задевать стенок пробирки. При посеве на скошенные питательные среды петлю с клетками микроорганизмов опускают почти до дна, где скапливается небольшое количество конденсационной воды. Слегка касаясь петлей поверхности плотной среды, но не разрыхляя ее, проводят от дна вверх штрих;

5. Петлю вынимают, обжигают края пробирок и внутренние концы пробок, после чего пробирки закрывают;
6. Петлю вновь прокалывают в пламени горелки.

1. Для выделения изолированных колоний из бактериальной смеси №1 сделать посев штрихом в чашку Петри с мясопептонным агаром по методу истощающего штриха (см. раздел 5.1.3). Далее чашки помещают в термостат с температурой 37 0С для культивирования в течение 1...2 суток.

2. Для выделения спорообразующих бактерий бактериальную смесь №2 нагреть на водяной бане до 75...85 0С и выдержать в течение 20...30 мин. Далее смесь охладить и сделать посев штрихом бактериологической петлей на поверхность скошенного мясопептонного агара в пробирку. Посев культивируют в течение 1...2 суток при 37 0С.

3. Для выделения подвижных форм бактерий из гниющего мяса по методу Шукевича маленький кусочек мяса стерильной петлей или иглой осторожно (по стенке, где нет питательной среды) вносят в конденсат свежеприготовленного скошенного мясопептонного агара. Пробирки термостатируют при 37 0С в течение 1...2 суток.

4. Для выделения молочнокислых бактерий из сырого молока 0,5 мл молока вносят стерильной пипеткой в пробирку со стерильным обезжиренным молоком с добавлением 5 % этилового спирта. Далее пробирки помещают в термостат с температурой 30 0С и проводят культивирование в течение суток.

Контрольные вопросы

1. Что такое питательные среды?
2. Микроорганизмы, которые встречаются в пищевых продуктах, являются хемоорганогетеротрофами. Что это значит?
3. Охарактеризуйте пищевые потребности хемоорганогетеротрофов.
4. Какие требования предъявляются к питательным средам?
5. Каким образом готовятся плотные питательные среды и для чего они используются?

6. Почему в качестве уплотнителя для питательных сред лучше использовать агар-агар, а не желатин?
7. На какие группы делятся питательные среды по происхождению и составу?
8. Что такое синтетические среды и в каких случаях они применяются?
9. Для каких целей используются универсальные, избирательные и дифференциально-диагностические среды?
10. Приведите примеры универсальных, избирательных и дифференциально-диагностических питательных сред.
11. Что такое стерилизация? Какие методы стерилизации Вам известны?
12. Какими способами можно стерилизовать посуду?
13. Какими из известных Вам способов можно стерилизовать питательные среды?
14. Перечислите основные этапы пересева микроорганизмов из пробирки в пробирку.

Лабораторная работа №5

Изучение биохимических свойств микроорганизмов.

Цель: Ознакомиться с методами изучения ферментативных свойств микробов и принципами идентификации бактерий.

Оборудование, материалы: среды Гисса, с добавлением углеводов-субстратов (глюкоза, лактоза, манноза, сахароза, галактоза и др.) и одного из индикаторов (ВР, Андрэде, метиловый красный). Обезжиренное молоко, чашки Петри, желатин, ацетата свинца, бульон Хоттингера, бульон с 0,1% L-триптофана, реактив Эрлиха, этанол, соляная кислота, среда Кристенсена, МПБ

План

1. Биохимические (ферментативные) свойства микроорганизмов.

1.1. Выявление сахаролитической активности.

1.2. Выявление протеолитической активности и активности других ферментов.

1.3. Определение гемолитической активности.

2. Принципы идентификации микроорганизмов.

Вопросы для изучения

1. Перечислите основные биохимические свойства микроорганизмов.
2. Что понимают под аэробным окислением или сбраживание углеводов?
3. Какие бактерии осуществляют гидролиз крахмала?
4. Что показывает разжижение желатины?
5. Какие тесты существуют для определения образования аммиака, индола, сероводорода, каталазы, уреазы и др.?
6. Перечислите группы бактерий по отношению к молекулярному кислороду.
7. Укажите состав сред Гисса.
8. Как проводят определение гемолитической активности бактерий?
9. Перечислите основные принципы идентификации микроорганизмов.

Задания для студентов.

Задание 1. Изучение сахаролитической активности микроорганизмов.

Задание 2. Тесты на сероводород, индол, аммиак, каталазу, на редуцирующую способность бактерий.

Ход работ:

1. Изучение сахаролитической активности микроорганизмов.

Готовят среды Гисса, с добавлением углеводов-субстратов (глюкоза, лактоза, манноза, сахароза, галактоза и др.) и одного из индикаторов (ВР, Андрэде, метиловый красный). Проводят посевы культур микроорганизмов. Результат учитывают через 24-48 часов и через 10-14 суток по изменению окраски соответствующего индикатора.

2. Тесты на гидролиз казеина, на желатиназу, на сероводород, индол, аммиак, уреазу, на редукцию нитратов, на

каталазу, на оксидазу, на редуцирующую способность бактерий.

Тест на гидролиз казеина в плотных питательных средах: обезжиренное молоко диализуют для удаления лактозы, которая ингибирует гидролиз казеина. В расплавленный питательный агар с двойной концентрацией агар-агара добавляют равный объем стерилизованного автоклавированием диализованного молока. Исследуемую культуру бактерий засевают «штрихом» на поверхность питательной среды, разлитой в чашки Петри. Посевы инкубируют до 14 сут. Перед учетом результатов поверхность среды заливают 10%-м раствором соляной кислоты. Положительный результат — просветление среды вокруг колоний.

Тест на желатиназу: культуру микроорганизма засевают уколом в столбик питательного бульона, содержащего 12 % желатины. После культивирования опытную и контрольную (незасеянную) пробирки охлаждают под холодной водой и по «текучести» желатины делают заключение о наличии фермента.

Тест на сероводород: узкие полоски фильтровальной бумаги смачивают в 5%-м растворе ацетата свинца, высушивают, стерилизуют. Культуру микроорганизма засевают в питательную среду в пробирке, после чего индикаторную бумагу помещают в пробирку (не должна касаться среды) и закрепляют пробкой. Выделяющийся сероводород реагирует с ацетатом свинца, и образующийся сульфид свинца вызывает почернение бумаги (положительный результат). Описанный метод выявления сероводорода при помощи индикаторных бумажек считают одним из наиболее чувствительных, разработаны и другие методы.

Тест на индол: исследуемую культуру целесообразно выращивать на средах, богатых триптофаном, при расщеплении которого образуется индол (бульон Хоттингера, бульон с 0,1% L-триптофана). К выращенной культуре добавляют 1...3мл эфира, встряхивают, отстаивают и вносят 0,5 мл реактива Эрлиха (парадиметиламинобензоальдегид-1 г, 96%-й этанол - 95 мл, соляная кислота - 20 мл). Через 5 мин учиты-

вают результат. Появление на границе эфира и питательной среды красно-фиолетового окрашивания свидетельствует о наличии индола.

Тест на аммиак: исследуемую культуру засевают в жидкую питательную среду в пробирке. Между пробкой и стенкой пробирки закрепляют полоску розовой лакмусовой индикаторной бумажки. Посевы инкубируют в термостате 1...5сут. Посинение лакмусовой бумажки свидетельствует о выделении аммиака.

Тест на уреазу: исследуемую культуру микроорганизма засевают на среду Кристенсена (пептон -1 г, хлорид натрия -5 г, дигидрофосфат калия -2 г, агар-20 г, глюкоза -1 г, 0,2%-й раствор фенолрота - 6 мл, 20%-й раствор мочевины -100 мл, вода дистиллированная -1000 мл) и выращивают 1...4сут. Положительный результат - покраснение среды в результате ее защелачивания.

Тест на редукцию нитратов выявляет восстановление нитратов до нитритов. Культуру микроорганизма засевают в МПБ, содержащий 0,2% нитрата калия, инкубируют 48...72 ч, затем в опытную и контрольную пробирки добавляют по 1 мл реактива с крахмалом (растворимый крахмал — 1 г, вода дистиллированная — 100 мл, йодид калия — 0,5 г). К этому раствору перед постановкой реакции добавляют несколько капель 10%-го раствора соляной кислоты. Положительный результат — темно-синее окрашивание.

Тест на каталазу: бактериальную массу снимают с поверхности агара бактериологической петлей и суспендируют в капле 3%-го раствора перекиси водорода на предметном стекле. Положительный результат — образование пузырьков газа.

Тест на оксидазу: фильтровальную бумагу прочитывают 1%-м раствором тетраметилпарафенилендиаминадигидрохлорида. Бактериальную массу петлей наносят на поверхность бумажной полоски. Положительный результат — фиолетовое или пурпурное окрашивание через 10...60 с.

Тест на редуцирующую способность бактерий (в метиленовом молоке) основан на следующей особенности: при окислительно-восстановительных реакциях у бактерий акцептором водорода может быть кроме молекулярного кислорода ряд органических красителей, которые, присоединяя водород, восстанавливаются и обесцвечиваются. Такие свойства отмечены у лакмусовой настойки, метиленового синего, малахитового зеленого и т. д.. Например, молоко с метиленовым синим готовят так: молоко подщелачивают 10%-м раствором карбоната натрия до pH 7,2 и добавляют 20 мл 1%-го водного раствора метиленового синего на 1000 мл. Готовая среда голубого цвета. Результат учитывают через сутки инкубирования посевов. В случае редукции красителя среда окрашена в кремовый цвет.

Термины и определения

Желатина – экстракт из тканей, содержащих много коллагена (кости, хрящи, сухожилия и т.д.).

Индикатор Андрэдэ – кислый фуксин с раствором гидроксида натрия, при закислении дает покраснение среды. Индикатор входит в состав сухих сред Гисса.

Сахаролитическая активность микроорганизмов – посев микробов на сахаролитические среды, к которым относятся моносахариды, полисахариды.

Протеолитическая активность – протеолитические ферменты расщепляют белки питательной среды до промежуточных (пептоны, полипептиды, аминокислоты) или конечных (сероводород, индол, аммиак) продуктов.

Тест на индол – исследуемую культуру выращивают на средах, богатых триптофаном, при расщеплении которого образуется индол.

Тест на гидролиз казеина – обезжиренное молоко диализуют для удаления лактозы, которая ингибирует гидролиз казеина.

Лабораторная работа №6

Санитарно-гигиенический контроль на предприятиях отрасли

Цель: Ознакомиться с методами дезинфекции рабочего места, контролем чистоты рук, Химическим контролем профилактической дезинфекции, бактериологическим контролем дезинфекции путем смыва с поверхностей.

Теоретический материал.

Организация санитарно-гигиенического контроля на предприятиях пищевой промышленности.

Санитарно-гигиенический контроль условий производства на предприятиях пищевой промышленности осуществляется общегосударственной и ведомственными службами.

Государственный санитарный надзор осуществляется санитарно-эпидемиологической службой (СЭС) в форме предупредительного (при проектировании и строительстве) и текущего надзора за выполнением установленных для предприятий молочной промышленности санитарно-гигиенических требований. Текущий контроль может быть плановый и внеплановый.

Органы и учреждения государственного санитарного надзора наделены широкими полномочиями. Распоряжения и указания представителей санитарной службы являются обязательными для администрации предприятия. Их невыполнение несет за собой административную ответственность руководителей предприятий, цехов и отделов, отдельных работников.

Принудительные административные меры применяются и при выявлении нарушений, представляющих непосредственную угрозу для здоровья людей. В таких случаях может быть установлен запрет на дальнейшую эксплуатацию предприятия (например, запрет на выпуск продукции).

При особо серьезных нарушениях, повлекших или могущих повлечь за собой возникновение пищевых заболеваний или другие вредные последствия, органы санитарного надзора могут привлекать виновных к уголовной ответственности.

Внутриведомственный санитарный контроль осуществляют ведомственная санитарная служба и заводская лаборатория. Они контролируют выполнение требований Сан-

ПиНа для предприятий пищевой промышленности, регулярно следят за санитарным состоянием производства, за профилактическими обследованиями работников цехов и соблюдением ими правил личной гигиены. Результаты проведения санитарно-гигиенического контроля фиксируются в специальном журнале.

При отборе проб для микробиологических исследований представителями санитарно-эпидемиологической службы, микробиологи предприятия также проводят отбор проб и их исследование. В случаях систематических расхождений результатов, получаемых службой СЭС и ведомственными лабораториями, проводят по согласованию совместные исследования для уточнения методов анализа и интерпретации их результатов.

Оценка санитарного состояния воздуха производственных помещений

Воздух производственных помещений может стать источником микробного загрязнения молочных продуктов.

Санитарно-гигиеническая оценка воздуха производственных помещений проводится по двум микробиологическим показателям: общей бактериальной обсемененности (КМАФАнМ) и содержанию санитарно-показательных микроорганизмов – гемолитических стрептококков и стафилококков. Воздух производственных помещений считается чистым, если КМАФАнМ не превышает 1500 КОЕ/м^3 , а гемолитических стрептококков и стафилококков не более 16 в 1 м^3 . В качестве питательных сред используют мясопептонный агар (для определения КМАФАнМ) и кровяной агар (для определения гемолитических стрептококков и стафилококков).

Для определения микроорганизмов в воздухе используют седиментационный и аспирационный методы.

Седиментационный метод основан на самопроизвольном оседании пылинок и капель вместе с микроорганизмами на поверхность плотной питательной среды в открытых чашках Петри.

Аспирационный метод заключается в принудительном оседании микроорганизмов из воздуха на поверхности плотных питательных сред. Осуществляется аспирационный метод с помощью специальных приборов (например, прибора Кротова), снабженных вентиляторами, которые засасывают воздух в прибор через клиновидную щель. В приборе воздух ударяется о поверхность плотной питательной среды в открытой чашке Петри.

Помимо нормируемых микробиологических показателей в воздухе производственных цехов и холодильниках на предприятиях пищевой промышленности определяют наличие спор микроскопических грибов и дрожжей, произвольно оседающих на поверхности сусло-агара или среды Сабуро за 5 минут. Посевы культивируют при комнатной температуре в течение 5-и суток. Санитарно-гигиеническая оценка проводится по 3-х бальной шкале. Состояние воздуха отличное, если в посевах споры грибов и дрожжей не обнаружены; хорошее, если на поверхности среды оседает до 2 спор грибов, а споры дрожжей не выявлены; удовлетворительное, если в чашках Петри после культивирования вырастает не более 5-и колоний грибов и 2-х колоний дрожжей.

Для снижения бактериальной обсемененности воздуха на предприятиях молочной промышленности проводят проветривание и влажную уборку помещений. Снизить содержание микроорганизмов в воздухе можно также путем его фильтрации через воздушные фильтры, применяя физические и химические методы обеззараживания воздуха: обработку ультрафиолетовыми лучами, хлорсодержащими препаратами в виде испарений и аэрозолей. Эффективным способом является озонирование воздуха.

Оценка санитарного состояния воды

Вода, используемая на предприятиях пищевой промышленности, должна отвечать требованиям СанПиНа 2.1.4.1074-01 на питьевую воду.

Для оценки санитарного состояния воды в ней определяют общее микробное число – не более 50 КОЕ/см³; термотолерантные колиформные бактерии – не допускаются в 100

см³; общие колиформные бактерии также должны отсутствовать в 100 см³; споры сульфитредуцирующих клостридий - не допускаются в 20 см³; колифаги – в 100 см³. Исследование питьевой воды проводят один раз в квартал при пользовании городским водопроводом и один раз в месяц при наличии собственных источников водоснабжения в воде.

Общее микробное число воды (ОМЧ) – количество мезофильных аэробных и факультативноанаэробных микроорганизмов, способных образовывать колонии на питательном агаре при 37 °С в течение 24 часов.

К общим колиформным бактериям относятся грамотрицательные не образующие спор палочки, не обладающие оксидазной активностью, ферментирующие лактозу или маннит с образованием альдегида, кислоты и газа при температуре 37°С в течение 24 часов.

Термотолерантные колиформные бактерии обладают всеми признаками общих колиформных бактерий, которые, кроме этого способны ферментировать лактозу до кислоты и газа при температуре 44 °С в течение 24 часов.

Сульфитредуцирующие клостридии (преимущественно *Clostridium perfringens*) – спорообразующие анаэробные палочковидные бактерии, редуцирующие сульфит натрия на железо-сульфитном агаре в течение 24 часов при температуре 44 °С.

Колифаги – бактериальные вирусы, способные лизировать кишечную палочку и формировать зоны лизиса через 18±2 часа при температуре 37 °С на ее газоне на питательном агаре. Колифаги – индикаторы очистки питьевой воды в отношении энтеровирусов.

Способами обеззараживания воды являются хлорирование, озонирование, обработка ультрафиолетовыми лучами.

Контроль оборудования, трубопроводов, посуды, инвентаря, вспомогательных и упаковочных материалов, рук работников

Контроль аппаратов и оборудования. Контроль проводят непосредственно после мойки, дезинфекции и пропаривания перед началом работы.

Для проведения исследования готовят ватные или марлевые тампоны, которые закрепляют на деревянном или металлическом стержне и помещают в пробирки с 10 см³ воды. Пробирки с тампонами стерилизуют в автоклаве при 0,1 МПа в течение 20-30 минут. Смывы с крупного оборудования и аппаратов берут с помощью нержавеющей металлических трафаретов с вырезанной серединой (площадь выреза 10, 25 или 100 см³). Перед взятием пробы трафарет смачивают спиртом, обжигают и накладывают на исследуемую поверхность. Ограниченную поверхность промывают смоченным тампоном, затем тампон погружают в пробирку с водой и содержимое хорошо перемешивают. В смывной воде определяют общую бактериальную обсемененность и наличие кишечной палочки (путем посева на МПА и среду Кесслера). В смывах с хорошо вымытого оборудования общее количество микроорганизмов в смывной воде не должно превышать их содержания в чистой воде, поступающей на мойку. Кишечные палочки должны в смыве отсутствовать. Количество слизееобразующих бактерий не должно быть более 0-5 в 1 мл смыва.

Наличие кишечной палочки можно определить, используя среду Кода. В этом случае тампоном, смоченным в среде Кода, промывают исследуемую поверхность. Далее тампон погружают в среду, а пробирку помещают в термостат с температурой 42⁰С на 18-24 часа. О наличии кишечной палочки судят по изменению цвета среды с зеленого до желтого.

Контроль трубопроводов, рукавов, шлангов

Внутренняя поверхность трубопроводов, рукавов, шлангов недоступна для взятия проб с помощью тампонов. В этом случае общую бактериальную обсемененность и коли-индекс определяют в последней промывной воде. Эти показатели не должны отличаться от показателей воды, применяемой в производстве.

Качество мойки трубопроводов можно также оценить путем отбора 10 мл смывной воды в стерильную посуду с последующим центрифугированием при 1500-2000 об/мин в течение 10 минут и микроскопированием осадка в 10 полях зрения. При этом должно обнаруживаться не более 5-6 клеток микроорганизмов.

Контроль посуды и инвентаря

Для анализа санитарного состояния стеклянных бутылок и банок смыв делают путем обмывания внутренней поверхности последовательно 10 единиц посуды 20 см³ воды. Санитарное состояние бочек, бидонов, цистерн проверяют путем посева последней смывной воды. Смыв с мелкого инвентаря (мешалки, пробники, термометры и др.) готовят путем смачивания всей поверхности стерильным тампоном, а при анализе санитарного состояния стеллажей, лотков, ведер, лопат пользуются трафаретом. В смывах определяют общую бактериальную обсемененность и наличие кишечной палочки. Кишечная палочка должна отсутствовать в смывах.

Контроль вспомогательных и упаковочных материалов

Пергамент, фольгу, пленку, комбинированные материалы для упаковки молока и молочных продуктов разворачивают и с внутренней стороны берут смыв стерильным ватным тампоном (со 100 см³ поверхности). Определяют наличие микроскопических грибов и наличие кишечной палочки. Кишечная палочка в смывах должна отсутствовать, а содержание плесеней не должно превышать 5 в 1 см³ смыва.

Поваренную соль контролируют на общую бактериальную обсемененность. Для разведения берут 5 г соли и растворяют ее в 95 см³ воды. Содержание микроорганизмов в соли не должно превышать 100 КОЕ/г.

Сахар исследуют на наличие дрожжей и плесеней, растворяя 10 г сахара в 90 см³ воды. Дрожжи и микроскопические грибы должны отсутствовать.

Контроль чистоты рук и спецодежды работников

Анализ чистоты рук работников производят (без предварительного предупреждения) пред началом производственно-

го процесса только у рабочих, которые непосредственно соприкасаются с чистым оборудованием или продукцией.

Перед анализом тампон смачивают стерильной водой или физиологическим раствором и обтирают им обе руки и пальцы каждого работника. Тампон ополаскивают в воде, в которой проводилось его смачивание, хорошо взбалтывают, отбирают 1 мл и подготавливают разведения (1:10 и 1:100). Для определения общего количества микроорганизмов в 1 мл смыва производят посев разведений на МПА в стерильные чашки Петри и далее проводят термостатирование при 37 °С в течение 48 часов. Остаток смыва вместе с тампоном высевают в 5 см³ среды Кесслера или Кода, а затем проводят культивирование при температуре 42-43 °С в течение 18-24 часов. Наличие в смыве кишечной палочки недопустимо.

Можно применить и такой метод: в сложенные ладонями вместе кисти рук наливают 100 мл стерильной воды так, чтобы вода хорошо промыла пальцы. Стерильным тампоном протирают ладони и ногти. Воду собирают в стерильную склянку и туда же бросают тампон. Смывную воду перемешивают и производят аналогичные высевы. Чистоту рук оценивают по количеству микроорганизмов в 1 мл смыва при отсутствии кишечных палочек: Количество микроорганизмов в 1 мл смыва с рук До 1000 Отлично, 1000-5000 Хорошо, 5000-10000 Удовлетворительно, Свыше 10000 Плохо.

Периодически проводят контроль обработки рук хлорной известью, для чего отдельные участки рук протирают ватным тампоном, смоченным йодкрахмальным раствором (смесь растворов - 6% раствора йодистого калия и 4% раствора растворимого крахмала в равных соотношениях). Если тампон и поверхности рук в местах соприкосновения с тампоном окрашиваются в сине-бурый цвет, то это свидетельствует о присутствии ионов хлора.

Чистоту рук можно проверить также с помощью индикаторных бумажек для определения бактерий группы кишечной палочки. Для этого индикаторную бумажку смачивают в стерильной воде и накладывают на руку. Затем бумажку помещают в пакет, запаивают и термостатируют в течение 12 ча-

сов при 37⁰С. Появление розовых пятен свидетельствует о присутствии БГКП.

Халаты, куртки, передники, перчатки из ткани периодически исследуют на присутствие кишечных палочек посевом 1 см³ смывной воды в среду Кесслера. Кишечные палочки на спецодежде должны отсутствовать.

Задание 1. Провести дезинфекцию рабочего места раствором хлорамина.

Поставить на стол сосуд с дезраствором (2% раствором хлорамина или 2% раствора гидроксида натрия), контейнер для отходов, спиртовку, баночку со стерильной ватой, баночку со спиртом, штатив для пробирок, чашку Петри с карандашами по стеклу. Затем приготовить инструменты (шприц, иглы, пинцет) для стерилизации и кипятить в стерилизаторе. Отработать навык работы с пипеткой и грушей.

Задание 2. Химический контроль профилактической дезинфекции. Изучить йодкрахмальным методом контроля применения хлорсодержащих препаратов.

Техническое оснащение: 5% раствор хлорамина, тампоны ватные, смесь 3% раствора йодида калия с 2% крахмальным клейстером.

Методические указания: с помощью тампонов обрабатывают часть поверхности лабораторного стола размером 10 x 10 см. После этого другим тампоном, смоченным в растворе KI с крахмалом, проводят по обработанной поверхности. Специфическое окрашивание поверхности в этом месте говорит о применении для дезинфекции хлорсодержащих препаратов.

Задание 3. Бактериологический контроль дезинфекции путем смыва с поверхностей

Техническое оснащение: шаблоны 10x10см, пробирки с нейтрализатором (гипосульфат Na) или дистиллированной водой стерилизованные, ватные тампоны с пробками стерилизованные, чашки Петри с МПА или средой Хейфеца, спиртовки.

Методические указания: с помощью ватных тампонов, смоченных в растворе нейтрализатора и шаблонов, делают смывы с поверхности 10x10см, обработанной 5% раствором хлорамина и не обработанной. После этого тампоны промывают в пробирке с дистиллированной водой и делают высевы на чашки Петри. Чашки Петри помещают в термостат на 2 суток при 37°C. Учёт роста на чашках производят на следующем занятии.

Задание 4. Контроль чистоты рук

Техническое оснащение: чашки Петри с МПА.

Методические указания: делают высевы с рук на чашки Петри путем прикосновения пальцев к поверхности агара. После этого производят мытье рук с мылом и делают высевы на другие чашки Петри. Чашки помещают в термостат на 2 суток при 37°C. Учет роста на чашках производят на следующем занятии.

Задание 5. Бактериологическое исследование воздуха.

Техническое оснащение: Чашки Петри с МПА, аппарат Кротова.

1) Открыть чашки Петри на 5 минут, после чего закрыть и поместить в термостат при 37°C на 2 суток (седиментационный метод).

2) Определить бактериальную обсемененность воздуха аспирационным методом при помощи аппарата Кротова. Чашки с посевом ставят в термостат на 2 суток при 37°C.

Учет роста на чашках производят на следующем занятии.

Лабораторная работа №7

Исследование производственных дрожжей

Цель работы: Ознакомиться с морфологическими, свойствами дрожжей. Изучить микрофлору, сопутствующую производственным дрожжам. Изучить микробиологические методы контроля качества производственных дрожжей, применяемых при производстве хлеба. Научиться определять концентрацию дрожжевых клеток с помощью счетной камеры

Горяева, определять подъемную силу и кислотность дрожжей, процентное содержание мертвых клеток дрожжей.

Оборудование и материалы: Микроскоп; бактериологические петли; предметные и покровные стекла; счетная камера Горяева; фильтровальная бумага; 96 % этиловый спирт; лоток с рельсами; промывалка. Красители: метиленовая синь (1:40), синька Финка (раствор метиленовой сини 1:5000), карболовый фуксин Циля, 0,5 % спиртовой раствор йода; 5% раствор H_2SO_4 ; набор красок для окраски по методу Грама (бумажки, пропитанные генцианвиолетом, раствор Люголя; фуксин рабочий). Водная суспензия производственных дрожжей.

Теоретический материал

Дрожжи, используемые в хлебопечении и в бродильных производствах, относятся к семейству сахаромикетов, роду *Saccharomyces*.

Дрожжи-сахаромикеты имеют овальную форму (см. рис. 6а), размножаются в производственных условиях почкованием, а в неблагоприятных условиях – аскоспорами.

Температурный оптимум для размножения дрожжей находится в пределах 25...30 °С. Низкие температуры дрожжи переносят хорошо, хотя размножение их приостанавливается (минимальная температура развития дрожжей 2...3 °С). При температуре 40 °С рост и развитие дрожжей прекращается, дрожжи отмирают.

Культурные дрожжи относятся к ацидофилам, т. е. развиваются в кислой среде, оптимальное значение рН для дрожжей 4,5...5,0. Являются факультативными анаэробами. В аэробных условиях они активно растут и размножаются, а в анаэробных – осуществляют спиртовое брожение (эффект Пастера).

Дрожжи чувствительны к высокой концентрации растворенных в среде веществ. При высокой концентрации сахара в среде жизнедеятельность дрожжей прекращается, так как при этом увеличивается осмотическое давление среды и наступает плазмолиз клеток. Величина предельной концентрации сахара для различных рас дрожжей неодинакова.

Различают дрожжи верхового и низового брожения.

Дрожжи, используемые в хлебопекарном производстве

Роль дрожжей в хлебопекарном производстве заключается в разрыхлении теста. Дрожжи сбраживают сахара муки и мальтозу, образующуюся из крахмала с выделением спирта и углекислого газа. При этом образуются побочные продукты (уксусный альдегид, бутиловый, изобутиловый, изоамиловый спирты, органические кислоты, ароматические вещества – ди-ацетил и ацетоин, эфиры и др.), которые создают вкус и аромат хлеба.

При производстве пшеничного хлеба применяют дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, а при производстве ржаного хлеба – дрожжи двух видов *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces minor*, причем преобладают дрожжи второго вида. Дрожжи *Saccharomyces minor* отличаются более высокой кислотоустойчивостью, чем дрожжи первого вида, менее требовательны к источникам витаминного и азотного питания, более спиртоустойчивы.

Требования, предъявляемые к хлебопекарным дрожжам:

Должны быть устойчивы к высоким концентрациям соли (до 3 – 4 %) и сахара в тесте;

Должны хорошо размножаться при оптимальных значениях рН 4,5...5,0 и температуре 26...28 °С;

Должны обладать высокой бродильной энергией (мальтазной и зимазной активностью). *Мальтазная активность* – это время (в мин), необходимое для выделения 10 см³ СО₂ при сбраживании 10...20 см³ мальтозы при 30 °С дрожжами, взятыми в количестве 2,5 % к объему среды. Мальтазная активность характеризует способность дрожжей гидролизовать мальтозу муки и зависит от активности содержащегося в дрожжах фермента мальтазы. Мальтазная активность дрожжей хорошего качества должна быть не более 100 мин. *Зимазная активность* - это время (в мин), необходимое для выделения 10 см³ СО₂ при сбраживании 10...20 см³ глюкозы при 30 °С дрожжами, взятыми в количестве 2,5 % к объему среды. Зимазная активность дрожжей хорошего качества

должна быть не более 60 мин. О бродильной активности хлебопекарных дрожжей можно также судить по их *подъемной силе* – периоду времени (в мин), в течение которого тесто, замешанное на испытуемых дрожжах, поднимается до определенного уровня в формочке. Все эти показатели относятся к **технологическим показателям качества** хлебопекарных дрожжей;

Должны быть стойкими к инфицированию при хранении в прессованном виде и в высушенном состоянии.

Микрофлора производственных дрожжей

Культурные дрожжи должны быть стойкими к инфицированию. Тем не менее, посторонние микроорганизмы попадают в засевные производственные дрожжи при неправильном ведении технологического процесса, при недостаточно тщательной мойке и дезинфекции оборудования и коммуникаций, несоблюдении санитарного режима в отделении чистых культур и т.д.

Чаще всего производственным дрожжам сопутствуют молочнокислые, уксуснокислые бактерии и дикие дрожжи, которые, так же как и культурные дрожжи, используют сахара питательной среды в качестве основного источника питания, что снижает выход спирта. Эти микроорганизмы образуют органические кислоты и другие продукты, которые могут отрицательно влиять на органолептические показатели готовой продукции (хлеба, пива) и бродильную активность культурных дрожжей. Хлебопекарные дрожжи, инфицированные посторонними микроорганизмами, имеют низкую ферментативную активность и стойкость.

Молочнокислые бактерии чаще других микроорганизмов встречаются в производственных дрожжах. Они принадлежат к трем родам: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*. Стрептококки и лейконостоки имеют шаровидную форму клеток. Стрептококки располагаются друг относительно друга попарно, короткими и длинными цепочками, а лейконостоки в основном попарно. Отличием этих двух родов друг от друга является то, что лейконостоки в отличие от стрептококков образуют слизистые капсулы. Лактобациллы являются палоч-

ковидными бактериями, которые в зависимости от вида могут располагаться поодиночке или короткими цепочками. Общими признаками этих бактерий являются грамположительная окраска, отсутствие спорообразования, каталазу они не образуют, не восстанавливают нитраты в нитриты, являются факультативными анаэробами. Молочнокислые стрептококки хорошо развиваются в средах, содержащих 3...6 % спирта, а палочковидные формы молочнокислых бактерий не теряют своей активности даже при 10...12 % спирта.

Уксуснокислые бактерии относятся к двум родам *Acetobacter* и *Gluconobacter*. В производстве пива чаще всего встречаются бактерии вида *A. aceti*. Для этих бактерий характерна чрезвычайная изменчивость формы клеток – от эллиптических до палочковидных, прямых или слегка изогнутых. Грамотрицательные, спор не образуют, некоторые виды имеют слизистую капсулу. При росте в жидкой среде образуют пленки беловатого или сероватого цвета. Реакция на каталазу положительная. Аэробы. Оптимальное значение pH 5,4-6,3, но могут расти и при pH 4,0-4,5. Эти бактерии устойчивы к антисептическим веществам хмеля, высокой кислотности, толерантны к спирту. Некоторые виды выделяют соединения, токсичные для дрожжей.

Дикие дрожжи инфицирующие производственные дрожжи принято подразделять на две группы: Дикие дрожжи, принадлежащие к роду *Saccharomyces*; Дикие дрожжи, не принадлежащие к роду *Saccharomyces*.

При попадании в сусло на стадии брожения дикие дрожжи не могут интенсивно развиваться, так как их рост подавляется культурными дрожжами, количество которых по сравнению с содержанием инфицирующих пиво диких дрожжей значительно больше.

Дикие дрожжи, принадлежащие к роду Saccharomyces

В чаще всего встречаются следующие разновидности диких дрожжей-сахаромицетов: *S. diastaticus*, *S. pastorianum*, *S. bayanus*, *S. ellipsoideus*. В настоящее время все эти дрожжи принято относить к одному виду *Saccharomyces cerevisiae*, так как с точки зрения систематики различия в их признаках не

являются существенными для разграничения видов. Клетки этих дрожжей имеют овальную или эллиптическую форму. Размножаются в основном почкованием, но могут и спорообразованием. Факультативные анаэробы. Активно сбраживают сахара. Оптимальная температура развития 27-35 °С, рН – от 3,5 до 5,0.

Дикие дрожжи, не относящиеся к роду Saccharomyces

Из производственных дрожжей выделены следующие дрожжи этой группы: дрожжи родов *Candida*, *Torulopsis*, *Pichia*, *Hansenula*, *Brettanomyces*, *Rhodotorula* и др.

Дрожжи рода *Candida* имеют круглые, овальные или яйцевидные, а иногда удлиненные или неправильные формы клеток. Морфология клеток непостоянна и существенно меняется в зависимости от условий культивирования и питательной среды. Спор не образуют. На жидких средах развиваются преимущественно на поверхности в виде белой или сероватой пленки. Некоторые виды являются факультативными анаэробами, а другие – аэробами. Размножению большинства видов способствует присутствие в среде кислорода. Некоторые дрожжи этого вида продуцируют специфический белок, губительно воздействующий на культурные дрожжи (дрожжи-убийцы).

Дрожжи родов *Pichia* и *Hansenula* имеют клетки различной формы – от круглых и овальных до сильно вытянутых, иногда изогнутых. Многие виды образуют псевдомицелий. Образуют споры. Большинство видов – аэробы, некоторые виды относятся к факультативным анаэробам. Размножению способствует присутствие кислорода.

Дрожжи рода *Rhodotorula* обычно круглой, овальной, яйцевидной или удлиненной формы Спор не образуют.

Дрожжи рода *Torulopsis* (пивная торула) имеют круглую или овальную форму. Спор не образуют, плохо сбраживают сахара. Основным источником попадания этих микроорганизмов в производство является воздух.

Дрожжи рода *Brettanomyces* имеют клетки эллиптические, а также цилиндрические, удлиненно-продолговатые, нередко стрелозаостренные с одного конца. Образуют псевдо-

мицелий. Спор не образуют. Являются факультативными анаэробами. Плохо сбраживают сахара. На жидких средах образуют хлопьевидный или вязкий осадок, могут образовывать тонкую пленку. Многие виды устойчивы к высоким концентрациям спирта.

Помимо вышеперечисленных групп микроорганизмов, инфицирующих производственные дрожжи, в них могут присутствовать *гнилостные бактерии*. Это спорообразующие грамположительные бациллы и клостридии и грамотрицательные не образующие спор палочковидные бактерии. Гнилостные бактерии вызывают распад белковых веществ. В аэробных условиях они осуществляют полную минерализацию белка, вплоть до диоксида углерода, аммиака, сероводорода, воды и минеральных солей. В анаэробных условиях гнилостные бактерии образуют различные органические дурнопахнущие и ядовитые вещества. Особую опасность представляют маслянокислые бактерии (*Clostridium butyricum*, *Clostridium pasterianum*, *Clostridium saccharobutyricum* и др.) и нитритобразующие бактерии (например, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*). Маслянокислые бактерии образуют масляную кислоту, а нитритобразующие бактерии превращают нитраты в нитриты. Эти соединения даже в очень малых концентрациях (0,0005 %) подавляют развитие культурных дрожжей.

Микробиологический контроль хлебопекарных прессованных дрожжей включает:

Микроскопирование. При микроскопировании оценивают качество прессованных дрожжей – по величине, по однородности клеток и по наличию посторонних микроорганизмов (бактерий, диких дрожжей), процентному содержанию мертвых клеток.

Определение процентного содержания сахаромицетов и посторонних микроорганизмов с использованием плотных питательных сред проводят в случае резкого ухудшения подъемной силы и при снижении стойкости прессованных дрожжей. Упрощенный метод – посев на сусло-агар с мелом (подсчитывают общее количество выросших на среде коло-

ний и отдельно - колонии кислотообразующих бактерий, вокруг которых имеются зоны растворения мела). Усложненный метод – посев на несколько селективных питательных сред для выявления количества клеток посторонних микроорганизмов и распределения их по группам. В качестве селективных сред используют сусло-агар (8 % СВ) – для определения общего количества дрожжей и грибов; сусло-агар (12 % СВ) с мелом и нистатином (для определения молочнокислых бактерий); среда 10 на дрожжевой воде (для определения слизиобразующих бактерий – лейконостоков); молочный агар с нистатином (для определения гнилостных бактерий); дрожжевой агар с 4 % сахарозы и нистатином (для определения общего количества бактерий); синтетическая среда с лизином (для определения несовершенных дрожжей) и др. Состав этих сред и особенности их приготовления приведены в приложении 2. Общее количество дрожжей принимают за 100 % и определяют процентное содержание посторонних видов дрожжей, грибов и бактерий. В доброкачественных прессованных дрожжах допускается присутствие кислотообразующих бактерий не более 15...35 %, гнилостных дрожжей быть не должно, посторонних (диких) дрожжей – не более 30 %.

1. Определение подъемной силы и кислотности дрожжей

Дрожжи являются одноклеточными неподвижными микроорганизмами, широко распространенными в природе. Они встречаются в почве, на листьях, стеблях, плодах растений, в разнообразных пищевых субстратах растительного и животного происхождения.

Широкое использование дрожжей в промышленности основано на их способности вызывать спиртовое брожение.

Пекарские прессованные и сухие дрожжи вырабатывают на специализированных дрожжевых заводах. Питательной средой при выращивании дрожжей служит осветленная, очищенная, разбавленная водой свекловичная меласса — отход свеклосахарного производства. В ней содержатся необходимые для дрожжей сахара и многие другие питательные вещества; туда дополнительно вводят азот- и фосфорсодержащие

соли. Температуру мелассной среды при выращивании дрожжей поддерживают на уровне около 30 °С рН 4,5—5,5. В таких условиях дрожжи дышат, а не бродят; большая часть сахара используется для синтеза веществ клетки, при этом дрожжи активно размножаются. По накоплении определенного количества дрожжевых клеток их отделяют от среды, промывают водой, сгущают и прессуют до содержания влаги 73—75%. Полученную дрожжевую массу формуют в виде брикетов с содержанием дрожжевых клеток в количестве 8-12 млрд в 1г. Брикету упаковывают в бумагу и охлаждают до температуры 4 °С. Сушеные дрожжи выпускают с влажностью 8-10%.

Прессованные дрожжи - скоропортящийся продукт. Под действием гнилостных бактерий они могут подвергаться порче -размягчаться вплоть до разжижения с образованием неприятного запаха. Хранить прессованные дрожжи необходимо в камерах с искусственным охлаждением.

Техническое обеспечение работы: водный раствор NaCl с массовой долей 2,5 %; мука пшеничная II сорта с влажностью 14,5%; гидроксид натрия концентрации 0,1 моль/л; фенолфталеин - 1%-ный спиртовой раствор.

Определение подъемной силы дрожжей

На технических весах взвесить 0,31 г дрожжей, перенести их в фарфоровую чашку, добавить 4,8 мл раствора хлорида натрия, нагретого до 35 °С, и тщательно перемешать шпателем или пестиком. К полученному раствору добавить 7г муки, замесить тесто и придать ему форму шарика.

Шарик опустить в стакан с водой, нагретой до температуры 35⁰С, и поместить в термостат с той же температурой. Подъемная сила дрожжей характеризуется временем, прошедшим с момента опускания шарика в воду до момента его всплывания. Для определения подъемной силы, время подъема шарика в минутах умножают на коэффициент 3,5, полученный эмпирически.

Задание1. Определение кислотности дрожжей

На технических весах взвесить 10 г дрожжей. Навеску перенести в сухую фарфоровую чашку или стакан, добавить

50 мл дистиллированной воды, тщательно перемешать, взбалтывая до получения однородной массы. Полученную смесь оттитровать 0,1М раствором гидроксида натрия в присутствии индикатора фенолфталеина до появления розового окрашивания.

Кислотность дрожжей в пересчете на уксусную кислоту в мг на 100 г дрожжей вычисляют по формуле:

$$H = \frac{V \cdot 6 \cdot 100 \cdot K}{10},$$

где H - кислотность дрожжей, мг/100г;

V - объем 0,1М раствора гидроксида натрия, израсходованный на титрование, мл;

6 - количество уксусной кислоты, соответствующее 1 мл 0,1 м раствора щелочи, мг;

K - поправочный коэффициент 0,1м раствора NaOH;

100 - переводной коэффициент;

10 - масса дрожжей, г.

Задание 2 Определение процентного содержания мертвых клеток дрожжей

На предметное стекло наносят каплю разбавленной дрожжевой суспензии и каплю раствора синьки Финка (раствор метиленового синего концентрацией 1:5000). Через 2 мин препарат накрывают покровным стеклом, излишки воды убирают с помощью фильтровальной бумаги. Микроскопирование ведут в 5 полях зрения. При этом подсчитывают количество всех дрожжевых клеток, а также отдельно считают количества мертвых (окрашенных в синий цвет) клеток. Далее рассчитывают процентное содержание мертвых клеток.

Определение мертвых клеток в дрожжевой суспензии можно проводить и с помощью водного раствора красителя нейтрального красного в концентрации 1:10000. При этом мертвые клетки окрашиваются в красный цвет, а в живых клетках окрашиваются только включения цитоплазмы. При окрашивании дрожжевой суспензии раствором нейтрального красного микроскопирование ведут через 15 мин после окраски.

Задание 3. Определение концентрации дрожжевых клеток с помощью счетной камеры Горяева

Для подсчета клеток в дрожжевой суспензии используют счетные камеры Горяева, Тома-Цейса, Бюркера и др.

Счетная камера Горяева (рис. 15) представляет собой толстое предметное стекло, разделенное четырьмя прорезями на три поперечно расположенные площадки. Центральная площадка продольной прорезью делится пополам. На каждой половинке выгравирована микроскопическая сетка. Сетка разделена на большие и малые квадраты: площадь большого квадрата равна $1/25 \text{ мм}^2$, малого – $1/400 \text{ мм}^2$. Боковые площадки расположены на 0,1 мм выше центральной (глубина камеры) и служат для притирания покровного стекла.

При работе с камерой необходимо соблюдать определенный порядок ее заполнения. Вначале углубление с сеткой покрывают специальным шлифованным покровным стеклом и, слегка прижимая, смещают покровное стекло в противоположные стороны до появления колец Ньютона. Это указывает на то, что покровное стекло притерто к сторонам камеры. После этого заполняют камеру исследуемой дрожжевой суспензией. Суспензию вносят через бороздки камеры капилляром или пипеткой. Подсчет клеток производят через 3...5 мин после заполнения камеры, чтобы клетки осели и при микроскопировании были видны в одной плоскости.

Камеру помещают на предметный столик и рассматривают в затемненном поле зрения с объективами вначале на х8, а затем на х40. Клетки подсчитывают в 10 больших или в 20 маленьких квадратах, перемещая их по диагонали. Учитывают все клетки, лежащие в квадрате сетки и на пограничных линиях, если они больше, чем наполовину лежат внутри квадрата. Клетки, пересеченные пограничной линией пополам, считают только на двух их четырех сторон квадрата. При подсчете количество клеток в большом квадрате не должно превышать 20...30, а в малом - 10, в противном случае делают разведение.

Количество клеток в 1 см^3 исследуемой суспензии вычисляют по формуле:

$$M = a \cdot n \cdot 10^3 / S \cdot h,$$

где M – число клеток в 1 см^3 дрожжевой суспензии;

a – среднее число клеток в квадрате сетки;
 n – разведение дрожжевой суспензии (если оно применялось);
 S – площадь квадрата сетки, мм²;
 h – глубина камеры.

Пример: При подсчете взвеси дрожжей в камере Горяева обнаружено 20 дрожжевых клеток в одном большом квадрате. Густая взвесь предварительно была разведена 1:100. Следовательно, $M = 20 \cdot 1000 \cdot 25 \cdot 100 / 0,1 = 5,0 \cdot 10^8$ кл/см³.

Оформление и анализ результатов исследований

Студенты конспектируют теоретический материал и методы микроскопического исследования производственных дрожжей. Определяют морфологическое состояние, концентрацию мертвых клеток. Подсчитывают концентрацию дрожжевых клеток с помощью камеры Горяева. Микроскопическую картину, отражающую морфологическое состояние дрожжей зарисовывают. Делают вывод о качестве исследованных дрожжей.

Контрольные вопросы

1. Охарактеризуйте морфологические и физиологические свойства дрожжей – сахаромицетов.
2. Какие дрожжи используются в производстве пшеничного и ржаного теста? Перечислите требования, предъявляемые к хлебопекарным дрожжам. Какие микроорганизмы чаще всего инфицируют производственные дрожжи?
3. Как осуществляют микробиологический контроль хлебопекарных дрожжей?
4. Как определить концентрацию клеток в дрожжевой суспензии?

Лабораторная работа №8

Микробиологическое исследование продуктов питания (занятие 1)

Цель работы: Ознакомиться с принципами проведения микробиологического контроля сырья, полуфабрикатов и готовой продукции. Освоить методы определения микроорганизмов в пищевых продуктах в соответствии с требованиями нормативной документации. Изучить качественный состав микрофлоры исследуемого продукта.

Оборудование, материалы: Исследуемые пищевые продукты крем; пробирки с 9 мл стерильной воды; стерильные пипетки на 1 мл и чашки Петри; пробирки со стерильными питательными средами: с МПА или средой для определения КМАФАнМ; со средой Сабуро или сусло-агаром; средой Кесслера с поплавками; с соевым агаром и т.п.; набор красок по Граму; бактериологические петли и препаровальные иглы; фильтровальная бумага; предметные и покровные стекла; микроскоп; спиртовка; лоток с рельсами; промывалка; термостаты.

Студенты знакомятся с принципами микробиологического контроля на предприятиях пищевой промышленности; группами микробиологических критериев безопасности пищевых продуктов особенностями проведения и схемой микробиологического исследования кондитерского крема. Далее они готовят разведения анализируемого продукта и проводят посев этих разведений на плотные и жидкие питательные среды для определения нормируемых микробиологических показателей и определения содержания микроорганизмов.

При проведении микробиологического исследования пищевых продуктов руководствуются медико-биологическими требованиями и санитарными нормами качества продовольственного сырья и пищевых продуктов.

Теоретическая часть

Кремовые кондитерские изделия

Кремы, используемые для изготовления тортов и пирожных, является скоропортящейся продукцией, которая может послужить причиной пищевых отравлений. Помимо различных споровых и неспоровых бактерий, дрожжей, спор плесеней, в кремах могут присутствовать патогенные микроорганизмы. Особенно опасен заварной крем, который отлича-

ется от других кремов низкой концентрацией сахара, повышенной влажностью и содержанием муки. Помимо того, что заварной крем быстро закисает в результате развития кислотообразующих бактерий, в нем могут развиваться токсигенный золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) и некоторые условно-патогенные микроорганизмы (например, энтеропатогенные кишечные палочки). Следует помнить, что накопление токсинов в кремовых изделиях происходит при температуре от 15 до 22 °С.

Причинами инфицирования крема может быть сырье (молоко, сливки, сахар, масло, яйца). Нарушение технологического режима и санитарных правил при изготовлении и хранении крема и кремовых изделий приводит к интенсивному развитию микроорганизмов, внесенных с сырьем и микроорганизмов, попадающих в крем в процессе его производства и хранения. Поэтому, в соответствии с требованиями по хранению и реализации скоропортящихся продуктов торты и пирожные с различными кремами разрешается хранить при температуре не выше 6 °С в течение ограниченного времени (например, с белково-сливочным кремом не более 72 часов).

Готовые кремовые изделия подвергают микробиологическому контролю. КМАФАнМ в зависимости от вида крема должно быть не выше значения $1 \cdot 10^4$ - $1 \cdot 10^5$ КОЕ/г; БГКП не допускаются в 0,01 г; золотистый стафилококк – в 1 г заварного и в 0,01 г сливочного крема. Патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы должны отсутствовать в 25 г крема.

Схема разведения пищевого продукта и проведения микробиологического исследования

Для приготовления разведений продукта используют пробирки с 9 см³ стерильной воды. Иногда для приготовления разведений используются стерильные растворы разбавленного фосфатного буфера, изотонического раствора хлорида натрия, пептонной воды или лимоннокислого натрия. В первую пробирку стерильной пипеткой вносят 1 см³ продукта. Новой стерильной пипеткой тщательно перемешивают содержимое пробирки (разведение 1:10). Затем этой же пипет-

кой из пробирки с разведением 1:10 отбирают 1 см³ жидкости и переносят во вторую пробирку с водой (разведение 1:100). Количество разведений рассчитывают таким образом, чтобы в чашках Петри выросло от 30 до 300 колоний.

Так, при исследовании пастеризованного молока рекомендуется готовить I, II и III разведение продукта, так как нормируемое значение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в питьевом молоке не более 50...200 тыс. КОЕ/см³

1 г крема или маргарина взвешивают с соблюдением правил асептики и вносят в пробирку с 9 см³ воды. Затем пробирку помещают в водяную баню с температурой 50...55 °С. Выдерживают пробирку на водяной бане до полного расплавления крема. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и для последующих разведений отбирают 1 см³ жидкости, находящейся под слоем масла;

Чашечные методы количественного учета микроорганизмов

Сущность чашечных методов количественного учета микроорганизмов заключается в посеве разведений продукта на стерильные плотные питательные среды в чашки Петри с последующим культивированием и подсчетом выросших в чашках колоний. При этом считается, что каждая колония является результатом размножения одной клетки.

Учет результатов при использовании чашечных методов

Количество выросших колоний подсчитывают в каждой чашке, поместив ее вверх дном на темном фоне, пользуясь лупой с увеличением от 4 до 10 раз. При большом количестве колоний и равномерном их распределении дно чашки делят на сектора, подсчитывают число колоний в 2-3 секторах, находят среднеарифметическое число колоний и умножают на разведение (10 – при первом разведении продукта, 100 – при втором разведении и т.д.).

Если инкубированные чашки с первым разведением (1:10) не содержат колоний, то результат выражают так: меньше 1х10 КОЕ/см³ (КОЕ – колониеобразующие единицы);

Если в чашках Петри с I разведением (1:10) содержится меньше, чем 15 колоний, то результат выражается так: количество микроорганизмов менее $M \times 10$ КОЕ/г, где М – число выросших колоний;

Если количество колоний более 15, то подсчитывают количество колоний в чашках, умножают на разведение и полученный результат округляют в соответствии с ГОСТом 26670-91 «Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов»:

- до числа, кратного 5, если количество колоний в чашке менее 100;
- до числа, кратного 10, если количество колоний в чашке более 100.

Пример: Посеяно I разведение продукта 1:10. В чашке Петри выросло 194 колонии. Полученный результат округляем до 200.

Количество микроорганизмов в продукте:
 $200 \times 10 = 2,0 \times 10^3$ КОЕ/г.

Чашечными методами определяют следующие микробиологические показатели: КМАФАнМ, количество спор грибов и дрожжей, содержание гнилостных бактерий, коагулазоположительных стафилококков.

Задание 1. Определение мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ)

Перед посевом чашки маркируют.

По 1 см³ разведений продукта вносят в чашки Петри. Пипетку с посевным материалом держат под углом 45⁰С, касаясь концом пипетки дна чашки. Затем в каждую чашку наливают по 12-15 см³ мясопептонного агара или среды для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, расплавленной и охлажденной до 45⁰С. Сразу после заливки агара содержимое тщательно перемешивают путем легкого вращательного покачивания для равномерного распределения посевного материала. Если ожидают ползучий рост микроорганизмов посева после застывания агара заливают вторым слоем питательной среды или 3...5 см³ водного раствора агара. После застывания

среды чашки Петри переворачивают крышками вниз и помещают в термостат при $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 72 часа (допускается предварительный учет через 48 часов с последующим окончательным учетом через 24 часа).

Задание 2. Определение количества грибов и дрожжей

Ведут так же, как и определение КМАФАнМ, только в качестве питательной среды используют сусло-агар или среду Сабуро. Инкубацию посевов ведут при температуре 24°C в течение 5 суток с предварительным учетом через 3 суток.

Задание 3. Определение протеолитических (гнилостных) бактерий

Соответствующее разведение продукта засевают на молочный агар инкубацию посевов проводят при 30°C в течение 72 часов. Протеолитические бактерии на молочном агаре при своем росте образуют зоны просветления агара (зоны протеолиза). Пептонизирующие бактерии образуют узкие зоны пептонизации.

Задание 4. Определение коагулазоположительных стафилококков

Ведут так же, как и определение КМАФАнМ. В качестве питательной среды используют молочно-солевой или желточно-солевой агар. Культивирование проводят при 37°C в течение 24...48 часов. При росте на желточно-солевом агаре вокруг колоний образуются перламутровые зоны помутнения агара, а на молочно-солевом агаре – небольшие зоны пептонизации.

Задание 5. Определение аэробных спорообразующих бактерий рода Bacillus

Исследуемый материал или разведение продукта перед посевом пастеризуют при $75...85^\circ\text{C}$ в течение 20 мин. Далее ведут определение так же, как и при определении КМАФАнМ. После пастеризации вегетативные клетки погибают, а споры после посева на МПА и культивирования при 37°C прорастают и в течение 24...48 час образуют колонии.

Методы, основанные на накоплении микроорганизмов с последующей их идентификацией

Эти методы используются для выявления микроорганизмов, содержание которых незначительно в сравнении с общим количеством микроорганизмов. *Сущность этих методов* заключается в посеве продукта или его разведений на накопительные жидкие среды. Если после культивирования обнаруживают рост микроорганизмов (образование осадка, помутнение среды, накопление газа в поплавках), то в дальнейшем проводят пересев из пробирок, в которых замечен рост на дифференциально-диагностические среды для идентификации выросших на накопительной среде микроорганизмов.

К таким методам относятся определение наличия БГКП, сальмонелл.

Определение бактерий группы кишечной палочки

Для посева используют то количество продукта, в котором предусматривается отсутствие БГКП (1 см³ молока или 1 см³ первого разведения молока). Посев проводят в пробирки со средой Кесслера с поплавками. Посевы помещают в термостат с температурой 37⁰С на 24 часа.

При отсутствии признаков роста (газообразования в поплавках, помутнения среды) дают заключение об отсутствии БГКП и соответствии исследуемого продукта нормативу на БГКП.

При положительной бродильной пробе для окончательного заключения о наличии в продуктах БГКП из подозрительных пробирок производят посев на чашки со средой Эндо или Левина. Посев производят петлей из каждой пробирки так, чтобы получить рост изолированных колоний. Чашки помещают в термостат.

Учет результатов. При отсутствии на среде Эндо или Левина колоний, типичных для БГКП (на среде Эндо – красных с металлическим блеском, на среде Левина – черных с металлическим блеском, темных с черным центром, сиреневых с темным центром) считают, что продукт соответствует нормативу. При наличии на среде Эндо или Левина типичных колоний их окрашивают по Граму и микроскопируют. Обнаружение грамотрицательных, не содержащих спор палочек

указывает на наличие БГКП в анализируемой пробе и несоответствии продукта по микробиологическому нормативу.

Определение сальмонелл

Асептически взвешенные навески сухих компонентов или стерильно отмеренные объемы жидких компонентов (обычно 25 г или 25 см³) засевают в колбы с магниевой средой или средой Мюллера (накопительные среды для сальмонелл), соблюдая соотношение продукта и среды не менее 1 : 9.

Для жидких продуктов допускается использование среды с двойной концентрацией ингредиентов при соотношении продукта и среды 1 : 1.

Колбы с посевами помещают в термостат с температурой 37 °С на 18...24 часа.

После инкубации в термостате производят высев из колб с накопительными средами на поверхность дифференциально-диагностических сред (среду Плоскирева или висмут-сульфитный агар). Для получения отдельных колоний петлей берут минимальное количество посевного материала и производят посев штрихом. Чашки с посевами помещают в термостат с температурой 37 °С. Проверку посевов осуществляют дважды: через 24 и 48 ч после инкубации в термостате.

Учет результатов. На среде Плоскирева колонии сальмонелл бесцветные, прозрачные, плоские, на висмут-сульфитном агаре – черные, с характерным металлическим блеском, зеленоватые с черным ободком, при этом наблюдается прокрашивание в черный цвет участка среды под колонией.

При отсутствии типичных колоний сальмонелл на каждой из сред конечный результат анализа записывают как «отрицательный», т.е. в исследуемой массе продукта сальмонеллы отсутствуют.

При наличии на любой из питательных сред на чашках Петри типичных или подозрительных колоний на сальмонеллы, производят их дальнейшее изучение по биохимическим и другим признакам.

Определение анаэробных сульфитредуцирующих клостридий

В пробирки, содержащие 9 см³ расплавленной и охлажденной до 45 °С плотной среды Вильсона-Блера вносят, соблюдая правила асептики, 1 см³ соответствующих разведений исследуемого продукта. Тщательно перемешивают содержимое пробирки, помещают в термостат и культивируют при 37°С в течение 24 часов. За положительный титр принимают то максимальное разведение продукта, в посеве которого произошло почернение среды.

Определение бактерий рода *Proteus*

Ведут методом Шукевича. Для определения 0,5 см³ анализируемой взвеси (разведения) вносят в конденсационную воду свежескошенного агара, не касаясь поверхности среды.

Вертикально поставленные пробирки термостатируют при 37 °С в течение 24 часов. На скошенном агаре палочка протей прорастает в виде голубоватого вуалеобразного налета. При микроскопии препарата обнаруживаются грамотрицательные неспорообразующие палочки.

Лабораторная работа №9

Микробиологическое исследование продуктов питания (занятие 2)

Студенты исследуют посевы разведений продукта, подсчитывают количество выросших колоний в чашках Петри на мясопептонном агаре или среде для определения мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, среде Сабуро и т.д. Изучают посевы продукта или его разведений в пробирках со средой Кесслера и поплавками. Если в пробирках со средой Кесслера газообразования в поплавках не наблюдается, то делают заключение об отсутствии БГКП во взятом на анализ объеме продукта. Полученные данные сравнивают с нормируемым значением. Затем изучают качественный состав микрофлоры исследуемого продукта.

Задание 1. *Изучение культуральных свойств выросших в чашках колоний*

Чашки с посевами внимательно осматривают. Отмечают колонии микроорганизмов, отличающиеся по культуральным свойствам. Рассматривая выросшие колонии в проходящем свете невооруженным глазом (макроскопически) и с помощью лупы описывают культуральные свойства.

Задание 2. Изучение морфологических свойств микроорганизмов

При изучении морфологии выросших в чашках колоний на предметных стеклах готовят фиксированные мазки (при исследовании колоний одноклеточных микроорганизмов: бактерий, дрожжей) или препараты типа «раздавленная капля» (при исследовании колоний микроскопических грибов).

Фиксированные мазки окрашивают по Граму и микрофотографируют с использованием иммерсионного объектива (на х90). При микрофотографировании препаратов обращают внимание на форму клеток; их взаимное расположение; наличие спор; отношение к окраске по Граму. Эти признаки позволяют отнести микроорганизмы к определенной группе.

Оформление и анализ результатов исследований

В отчете студенты кратко конспектируют теоретический материал. Результаты определения микробиологических показателей записывают, сравнивают с нормируемыми значениями. По результатам исследований студенты делают вывод о качестве исследованного продукта.

При изучении качественного состава микрофлоры продукта результаты исследований вносят в таблицу:

Культуральные и морфологические признаки выросших в чашках колоний

Культуральные свойства	Питательные среды					
	МПА		Среда Сабуро		..	
	

Форма колоний.						
Консистенция.						
Микроскопическая картина						

После заполнения таблицы делается вывод о качественном составе микрофлоры исследованного продукта

Контрольные вопросы

1. Какие микробиологические показатели относятся к группе показателей санитарного состояния пищевых продуктов?
2. Что такое общая бактериальная обсемененность (КМАФАнМ)? С какой целью определяется этот показатель?
3. В каких продуктах КМАФАнМ не определяется?
4. С какой целью в пищевых продуктах определяют БГКП?
5. Какие требования предъявляются к санитарно-показательным микроорганизмам?
6. С какой целью и в каких продуктах определяются условно-патогенные микроорганизмы?
7. Зачем в пищевых продуктах определяют содержание грибов и дрожжей? Во всех ли пищевых продуктах эти показатели нормируются?
8. Какие патогенные микроорганизмы нормируются в пищевых продуктах?
9. Какие микробиологические показатели нормируются в в кремовых изделиях, в колбасных изделиях
10. Как готовятся разведения пищевых продуктов?
11. В чем сущность чашечных методов определения микроорганизмов в пищевых продуктах?
12. Какие микробиологические показатели определяются чашечными методами?
13. В чем сущность методов, основанных на накоплении микроорганизмов с последующей идентификацией? Какие микробиологические показатели определяются этими методами?

14. Какими методами определяются КМАФАнМ, наличие БГКП, титр анаэробных сульфитредуцирующих клостридий?
15. Как описываются культуральные свойства выросших в чашках колоний микроорганизмов?

Список рекомендательной литературы

1. Мудрецова-Висс К.А. Микробиология, санитария и гигиена [текст] – учебник - Москва: ИНФРА-М, ФОРУМ, 2014. - 400 с
2. Беляев А. Г. Основы микробиологии [Текст]: учебное пособие / А. Г. Беляев, С. А. Чугунов, Е. Ю. Потребва. - Курск: ЮЗГУ, 2015. - 174 с.
3. Жарикова Г. Г. Микробиология продовольственных товаров. Санитария и гигиена: [Текст]: учебник / Г. Г. Жарикова. - М.: Академия, 2005. - 304 с.
4. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Отбор проб с туши для микробиологического анализа: [Текст] / Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии. - Введ. 2011-12-13. - М.: Стандартинформ, 2013. - 15 с.
5. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных: [Текст]. - Введ. 29.11.2010. - М.: Стандартинформ, 2011. - 14 с.