

Министерство образования и науки Российской Федерации

Владивостокский государственный университет
экономики и сервиса

Е.В. МАСЛЕННИКОВА

ОСНОВЫ МИКРОБИОЛОГИИ

Учебно-практическое пособие

Владивосток
Издательство ВГУЭС
2013

УДК 579
ББК 30.16
М31

Масленникова, Е.В.

М31 **ОСНОВЫ МИКРОБИОЛОГИИ** [Текст] : учебно-практическое пособие / Е.В. Масленникова. – Владивосток : Изд-во ВГУЭС, 2013. – 56 с.

Знания, изложенные в настоящем учебно-практическом пособии, дополняют теоретический курс, позволяют лучше усвоить его, знакомят с фактическим материалом на практике.

Для студентов, обучающихся по направлению 100800.62 «Товароведение».

УДК 579
ББК 30.16

© Издательство Владивостокского государственного университета экономики и сервиса, 2013

ВВЕДЕНИЕ

Лабораторные занятия по основам микробиологии проходят в лаборатории.

Входя в лабораторию, студент должен надеть халат. Во время выполнения лабораторных занятий необходимо соблюдать тишину; избегать излишнего хождения, открывания и закрывания двери, так как это усиливает движение воздуха.

Запрещается выносить за пределы лаборатории какие бы то ни было материалы (пробирки, краски и т.п.), принимать пищу во время перерыва. Личные вещи (книги, сумка) следует держать на отведенном для этого месте. По окончании занятий необходимо привести в порядок рабочий стол, тщательно вымыть руки и снять халат.

Инструменты после использования должны обезвреживаться прокаливанием на пламени или другими способами.

В учебной лаборатории за каждым студентом закрепляется постоянное место работы.

На лабораторном столе устанавливают микроскоп, спиртовку или газовую горелку, краски, бактериологическую петлю, мостик и ванночку для окраски препаратов, промывалку с водой, иммерсионное масло, нарезанную фильтровальную бумагу, предметные и покровные стекла.

Приборы, реактивы, инструменты на рабочем столе должны быть расставлены с учетом правил техники безопасности и так, чтобы их расположение не требовало лишних движений при работе.

Преподаватель во время занятий следит за тем, как студенты выполняют задания, в случае необходимости оказывает помощь.

На первом практическом занятии студенты должны ознакомиться с техникой безопасности и режимом работы в лаборатории.

Лабораторная работа № 1

МИКРОСКОП И ТЕХНИКА МИКРОСКОПИРОВАНИЯ

Цель занятия: усвоить правила пользования микроскопом.

План проведения занятия

1. Ознакомиться с устройством микроскопа.
2. Изучить правила работы с микроскопом.
3. Промикроскопировать готовые препараты микроорганизмов.

Задание 1. Изучить устройство биологического микроскопа. Изучая устройство микроскопа, необходимо просмотреть все его части.

Микробиология изучает организмы, большинство из которых нельзя рассмотреть невооруженным глазом, поэтому для установления их формы, размеров, строения используют микроскоп.

Микроскоп (гр. *micros* – малый, *scopeo* – смотрю) – это оптический прибор (рис. 1), состоящий из трех основных частей: механической, осветительной, оптической.

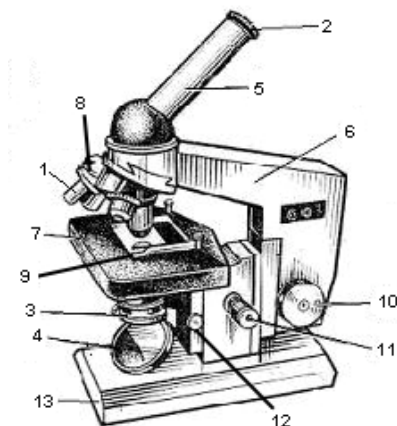


Рис. 1. Микроскоп биологический МБИ-1:

- 1 – объективы; 2 – окуляр; 3 – конденсор; 4 – зеркало; 5 – тубус;
6 – тубусодержатель; 7 – предметный столик; 8 – револьвер; 9 – клемма;
10 – макровинт; 11 – микровинт; 12 – винт конденсора; 13 – ножка

Механическая часть, или **штатив**, состоит из ножки, тубуса, тубусодержателя, предметного столика и винтов.

Ножка (13) подковообразной формы служит опорой микроскопа.

Тубус (5) – зрительная труба микроскопа. В верхнее отверстие тубуса свободно вставлен окуляр (2), на нижнем конце тубуса находится вращающийся вокруг своей оси «револьвер» (8), в который ввинчены 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 на «револьвере» против объектива имеется желобок, в который входит ступица (пружинка), закрепляющая объектив в рабочем положении (при попадании ступицы в желобок ощущается щелчок и упор).

Тубусодержатель (6) имеет форму дуги и используется в качестве ручки для переноса микроскопа.

Предметный столик (7) служит для размещения препарата. Препарат закрепляют имеющимися на столике зажимами – клеммами (9). В центре предметного столика находится отверстие для прохождения лучей света, освещающих препарат. На некоторых моделях микроскопов предметный столик может передвигаться в двух взаимно перпендикулярных направлениях с помощью двух винтов, симметрично расположенных на краях столика. Вместе со столиком передвигается и препарат, что дает возможность рассмотреть его в разных местах.

Винты – макрометрический, или макровинт (10), и микрометрический, или микровинт (11). С помощью этих винтов тубус можно передвигать вверх и вниз для установления его на необходимом расстоянии от препарата. При вращении винтов по часовой стрелке тубус опускается, при вращении против часовой стрелки – поднимается.

Макрометрическим винтом пользуются для ориентировочной установки объектива на фокус, т.е. на то расстояние от препарата, при котором он делается видимым.

Для точной установки служит *микрометрический* винт. Полный его оборот передвигает тубус на 0,1 мм. С микрометрическим винтом следует обращаться особо осторожно, вращая его только на четверть оборота в обе стороны очень медленно.

Осветительная часть микроскопа находится под предметным столиком и состоит из зеркала и конденсора с ирис-диафрагмой.

Зеркало (4) отражает лучи, падающие на него от источника света по направлению к конденсору. Одна сторона зеркала плоская, другая – вогнутая. При работе с конденсором пользуются плоским зеркалом; при работе без конденсора или при слабом освещении используют вогнутое зеркало. Зеркало подвижно.

Конденсор (3) служит для лучшего освещения препарата. Он собирает отраженные от зеркала световые лучи в пучок и направляет их через отверстие предметного столика на препарат. С помощью винта конденсор можно передвигать вверх и вниз. При поднятии и опускании

конденсора меняется угол сходимости лучей, падающих на препарат, вследствие чего меняется степень его освещенности. Чем ниже положение конденсора, тем слабее освещение препарата, чем выше, тем лучше он будет освещен. Обычно при работе с малыми увеличениями конденсор опускают, а при работе с большими увеличениями его поднимают.

Ирис-диафрагма помещена под конденсором, с ее помощью регулируют количество света, поступающего в конденсор. Диафрагма состоит из ряда подвижных металлических пластинок, которые рычагом могут сдвигаться и раздвигаться, в результате этого отверстие диафрагмы суживается или расширяется.

Оптическая часть микроскопа состоит из объективов и окуляров.

Объектив (1) имеет систему линз, заключенных в металлическую оправу. Линза, обращенная к предмету, называется фронтальной. Объектив обладает определенной увеличительной способностью и определенной глубиной фокуса. Объектив дает действительное, увеличенное, обратное изображение предмета, выявляет детали рассматриваемого объекта.

Биологические микроскопы модели МБИ-1, МБИ-3 имеют три объектива, которые дают разное увеличение. На оправе каждого объектива нанесены цифры, показывающие его увеличение: на одном – 8, на другом – 40, на третьем – 90.

Объективы подразделяют на сухие и иммерсионные. При рассматривании препарата сухим объективом (8 или 40) между его фронтальной линзой и препаратом находится воздух.

Вследствие того, что лучи света проходят среды (покровное стекло, воздух) с различными показателями преломления, часть их отклоняется и не попадает в объектив. При работе с иммерсионным объективом-90 для устранения светорассеивания расстояние между фронтальной линзой объектива и препаратом заполняют *кедровым (иммерсионным) маслом*. При работе объектив осторожно погружают в масло. Природное кедровое масло специально сгущают до такой консистенции, чтобы оно имело показатель преломления света приблизительно такой же, как стекло.

Окуляр (2) состоит из двух линз, заключенных в общую металлическую оправу. Верхняя линза называется глазной, нижняя – собирательной.

Биологические микроскопы снабжены тремя сменными окулярами. На оправе верхней линзы окуляра указано его собственное увеличение. Обычно окуляры дают увеличение в 7, 10, 15 раз. Окуляр увеличивает изображение, данное объективом.

Общее увеличение объекта, даваемое микроскопом, равно произведению увеличения объектива и окуляра. Например, применяя объектив-8 и окуляр-7, общее увеличение микроскопа будет равно 56; при объективе-40 и окуляре-10 – 400, при объективе-90 и том же окуляре – 900.

Пользуясь биологическим микроскопом, можно рассмотреть предмет размером не менее 0,2 мкм¹.

Помимо микроскопии с помощью биологического микроскопа для улучшения изображения и расширения границ видимости применяют и другие методы микроскопирования. Иногда, например, требуется узнать пространственную форму предмета. Чтобы изображение стало рельефно-объемным, стереоскопическим, предмет нужно рассматривать одновременно двумя глазами. Для этой цели применяют специальный *бинокулярный микроскоп с парными окулярами*.

Фазово-контрастная микроскопия позволяет искусственно повышать контрастность препаратов, что дает возможность значительно лучше изучать живые микроорганизмы. Увеличение контрастности достигается использованием особого приспособления к микроскопу.

Задание 2. Изучить правила работы с биологическим микроскопом. При ознакомлении с техникой микроскопирования необходимо обратить особое внимание на приемы установления препарата в фокус объектива и изменение степени освещения препарата.

Обращение с микроскопом требует навыков, поэтому, приступая к работе с ним, необходимо усвоить основные правила пользования микроскопом.

1. На рабочем столе микроскоп помещают тубусодержателем к себе на расстоянии 3–5 см от края стола. Перед началом работы следует осторожно мягкой сухой тканью удалить пыль с механических и оптических частей микроскопа, не касаясь пальцами линз.

2. Устанавливают правильное освещение поля зрения микроскопа. Для этой цели, смотря в окуляр, зеркалом направляют лучи света от настольного осветителя или естественного освещения в объектив. Объекты, подлежащие микроскопированию, рассматривают в проходящем свете. Настройка освещения производится с объективом-8. При правильной установке поле зрения микроскопа будет иметь форму круга, хорошо и равномерно освещенного.

3. На предметный столик помещают исследуемый препарат и закрепляют его клеммами.

4. Сначала препарат рассматривают с объективом-8, а затем переходят к большим увеличениям.

Необходимо помнить, что чем меньше увеличение дает объектив, тем больше при установке препарата на фокус будет свободное рабочее расстояние (расстояние между объективом и препаратом). При работе с объективом-8 расстояние между препаратом и объективом около 9 мм, с объективом-40 – около 0,6 мм и с объективом-90 – около 0,15 мм.

¹ Микромметр (микро) – тысячная доля миллиметра (0,001 мм).

Тубус микроскопа необходимо опустить вниз с помощью макрометрического винта осторожно, наблюдая за объективом сбоку и приблизить его к препарату (не касаясь его) на расстояние, меньше рабочего. Затем, глядя в окуляр, тем же винтом, медленно вращая его на себя, поднимают тубус до тех пор, пока в поле зрения не появится изображение изучаемого объекта.

После этого вращением микрометрического винта фокусируют объектив так, чтобы изображение предмета было четким. *Микрометрический винт можно вращать не более чем на четверть оборота в ту или другую сторону.*

При работе с иммерсионным объективом на препарат предварительно наносят каплю кедрового масла и, глядя сбоку, макрометрическим винтом опускают осторожно тубус микроскопа так, чтобы кончик объектива погрузился в каплю масла. Затем, глядя в окуляр, тем же винтом очень медленно поднимают тубус до тех пор, пока не увидят изображение. Точную наводку объектива на фокус производят микрометрическим винтом.

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

При просмотре препарата с объективом-8 конденсор опускают, при переходе на объектив-40 конденсор несколько поднимают, а при работе с объективом-90 конденсор поднимают вверх почти до предела.

6. Препарат рассматривают в нескольких местах. При изучении препарата следует все время медленно (в пределах четверти оборота) вращать микровинт по часовой стрелке и против нее, чтобы просмотреть предмет во всей толще и установить на фокус то один, то другой участок препарата.

Перед переходом от одного объектива к другому место препарата, где расположен изучаемый объект, следует поставить точно в центре поля зрения и только после этого повернуть «револьвер» с объективом.

7. Во время микроскопирования необходимо держать оба глаза открытыми и пользоваться ими попеременно.

8. После окончания работы следует снять препарат с предметного столика, опустить конденсор, поставить под тубус объектив-8, удалить мягкой тканью иммерсионное масло с фронтальной линзы объектива-90.

Задание 3. Промикроскопировать готовые препараты микроорганизмов.

Промикроскопируйте окрашенные препараты объективом-8, затем объективом-90. Рассмотрите внимательно микроорганизмы, обращая внимание на их форму; зарисуйте их.

Контрольные вопросы

1. Из каких частей состоит микроскоп?
2. Каково назначение макро- и микрометрического винтов? Как ими пользоваться?
3. Что такое сухие и иммерсионные объективы?
4. Зачем и как используют иммерсионное масло при работе с иммерсионным объективом?
5. Как устанавливается общее увеличение микроскопа?
6. Как регулировать степень освещенности препарата?

Лабораторная работа № 2 ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ БАКТЕРИЙ

Цель занятия: научиться готовить и окрашивать бактериальные препараты простым методом и по методу Грама. Ознакомиться с основными формами бактерий.

План проведения занятия

1. Ознакомиться с методами приготовления окрашенных препаратов.
2. Приготовить препараты из смеси микроорганизмов и окрасить их простым способом и по Граму.
3. Ознакомиться с морфологией бактерий.

Задание 1. Ознакомиться с методами приготовления окрашенных препаратов.

Для микроскопирования микроорганизмов необходимо соответствующим образом приготовить препарат. Препараты обычно готовят на предметном стекле. Нередко требуется еще и покровное стекло. Все стекла должны быть совершенно чистыми.

Различные способы окраски основаны на физико-химических особенностях микробной клетки и взаимодействии структур и ее веществ с используемыми реактивами.

Способы окрашивания делят на простые и сложные.

При простых способах окрашивания используют одну краску. Простая окраска применяется для ознакомления с морфологией бактерий.

При сложных способах окрашивания применяют два или более красящих вещества. Кроме красящих, используют различные обесцвечивающие вещества (спирт и др.). Такое окрашивание применяют для выявления деталей строения микроорганизмов и их дифференциации.

Методика приготовления окрашенного препарата состоит из нескольких операций.

Сначала готовят фиксированный мазок следующим образом.

1. *Приготовление мазка.* На середину чистого предметного стекла наносят маленькую каплю воды, в нее вводят немного бактерий, взятых с плотной питательной среды кончиком стерильной бактериологической петли, и тщательно перемешивают.

Бактериологическая петля представляет собой металлическую проволочку с закругленным кончиком, зафиксированную на металлическом петледержателе.

Если исследуемые микроорганизмы находятся в жидкой среде, то на предметное стекло наносят каплю этой микробной суспензии без добавления воды. Полученную слабомутную бактериальную суспензию равномерно распределяют (размазывают) тонким слоем по поверхности предметного стекла на площади 2–3 см².

2. *Высушивание*. Полученный мазок высушивают при комнатной температуре на воздухе или (для ускорения) в токе теплого воздуха над небольшим пламенем горелки, не допуская нагрева стекла (стекло при этом держат мазком вверх).

3. *Фиксация мазка*. Стекло с сухим мазком проводят 3–4 раза над пламенем горелки, слегка прикасаясь к нему той стороной, где мазок отсутствует. Мазки бактерий можно фиксировать этиловым спиртом, смесью этилового спирта и эфира и другими веществами (фиксаторами). Фиксация имеет целью убить клетки бактерий и закрепить мазок (зафиксировать) на стекле. Мертвые клетки окрашиваются лучше, чем живые.

Далее производят *окрашивание* мазка.

При простом способе окрашивания на охлажденный фиксированный мазок наносят 1–2 капли фуксина или метиленовой сини.

После выдержки мазка в краске в течение 40–60 с краску смывают с него слабой струей воды из бутылки. Промывание заканчивают, когда вода станет неокрашенной. Промытый препарат тщательно просушивают фильтровальной бумагой, прикладывая ее к мазку. Затем на препарат наносят каплю иммерсионного масла и микроскопируют с объективом-90.

При сложных способах окрашивания применяют несколько красящих веществ. Одним из самых распространенных сложных способов окрашивания является окраска по методу Грама. Она имеет большое значение для их распознавания.

Одни виды бактерий окрашиваются по этому способу и называются грамположительными (Г+), другие не окрашиваются и называются грамотрицательными (Г-).

Сущность метода заключается в том, что образующееся при окрашивании в цитоплазме клеток соединение красителя с йодом у грамположительных бактерий удерживается в клетке при обработке ее спиртом и они сохраняются окрашенными, а грамотрицательные обесцвечиваются. По-видимому, играет роль неодинаковая проницаемость для комплекса краситель – йод клеточной оболочки и цитоплазматической мембраны в связи с различием химического состава и их структуры у этих двух групп бактерий.

Грамположительные бактерии содержат много муреина (50–90%) и тейхоевые кислоты. Клеточные стенки у них более толстые – 20–80 нм.

У грамотрицательных бактерий клеточные стенки слоистые и более тонкие (14–17 нм). В них содержится много липидов, мало муреина (5–10%) и отсутствуют тейхоевые кислоты.

Методика приготовления препарата состоит из следующих операций.

1. На предметном стекле готовят фиксированный мазок исследуемых бактерий, как указано выше.

2. На мазок наносят 2–3 капли раствора генцианвиолета и через 2–3 мин окрашивания краску стряхивают с мазка.

3. Наносят 2–3 капли раствора Люголя (раствор йода в йодистом калии) и по истечении 1–2 мин смывают водой.

4. Препарат погружают в стаканчик с 96-м спиртом на 30–40 С затем быстро промывают водой. На обесцвечивание мазка спиртом следует обратить особое внимание. При недостаточной обработке все клетки сохраняют окраску, при избыточной – обесцвечиваются.

5. На препарат наносят разбавленный раствор фуксина на 1–2 мин, промывают водой и просушивают фильтровальной бумагой.

Грамположительные бактерии будут *фиолетовыми*, грамотрицательные – *красными*, так как обесцвеченные спиртом они воспринимают дополнительную окраску фуксином.

Задание 2. Приготовить препараты из смеси микроорганизмов и окрасить их простым способом и по Граму.

Препарат готовят, используя предметное стекло – тонкую стеклянную пластинку размером 76 × 26 мм с хорошо отшлифованными краями. Стекла должны быть чистыми, обезжиренными. Если стекла находятся в жидкой среде, их перед употреблением обсушивают фильтровальной бумагой.

1. Пробирку с культурой, из которой следует приготовить препарат, помещают на указательном и среднем пальцах левой руки и сверху прижимают большим пальцем так, чтобы хорошо была видна вся поверхность питательной среды с выросшими на ней микроорганизмами (рис. 2).

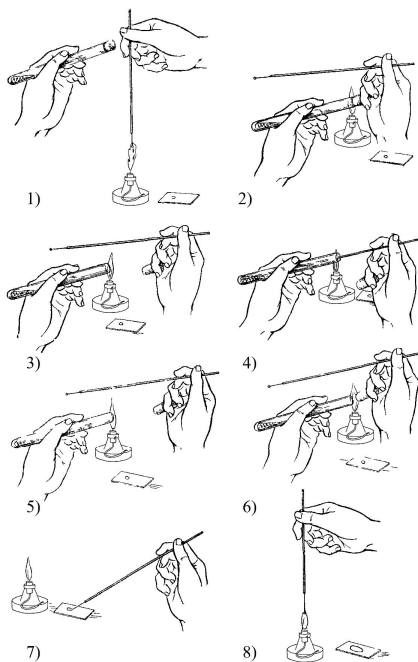


Рис. 2. Приготовление препарата для микроскопирования

При приготовлении препарата, необходимо петлю прожечь в пламени горелки, вынуть пробку из пробирки, захватив ее мизинцем правой руки, обжечь край пробирки в пламени спиртовки и внести петлю в пробирку. Затем необходимо охладить петлю о внутреннюю стенку пробирки и взять немного культуры, не нарушая поверхности питательной среды. Вынув петлю, пробирку закрывают и ставят ее в штатив. Далее берут в левую руку предметное стекло и наносят на него культуру с петли. Если среда с микроорганизмами жидкая, то предварительно необходимо обожженной над пламенем спиртовки или газовой горелки петлей нанести на предметное стекло каплю стерильной водопроводной воды.

2. Затем готовят фиксированные окрашенные препараты простым способом и по Граму.

3. Готовые окрашенные препараты рассматривают сначала объективом-8, затем иммерсионным объективом-90.

4. Зарисуйте увиденные микроорганизмы, обратите внимание на грамположительную (синюю) окраску бактерий и грамотрицательную (красную), а также на форму клеток, их группировку, наличие спор и их положение в клетке. Споры в окрашенных клетках не прокрашиваются, так как оболочка их мало проницаема для краски, и выглядят в виде светлого пятна в клетке.

Морфология бактерий. Большинство бактерий – одноклеточные организмы. Величина клеток различных бактерий сильно варьирует – от 0,5 до 10 мкм. По форме бактерии делятся в основном на шаровидные (кокки), палочковидные (цилиндрические) извитые (рис. 3).

Шаровидные бактерии различаются размерами и взаимным расположением отдельных клеток. Если после деления клетки располагаются одиночно, то их называют микрококками, если попарно – диплококками, по четыре – тетракокками, в виде цепочек различной длины – стрептококками; сочетание клеток по 8, 16 и более кокков в виде туюков или пакетов правильной формы – сарцины или педиококки, скопления кокков, напоминающие гроздья винограда, – стафилококки.

Палочковидные бактерии различаются по длине, диаметру, форме концов клеток, образованию спор, взаимному расположению и встречаются в виде одиночных клеток (монобактерии), либо соединенных попарно (диплобактерии), либо в виде цепочек (стрептобактерии).

Палочки, образующие споры, относятся к родам *Bacillus* и *Clostridium*. В каждой клетке образуется только одна спора. Расположение спор в зависимости от вида бактерий бывает центральным или ближе к одному концу. Если клетки образуют споры, не превышающую ее ширину, то такие бактерии называют бациллами. Диаметр спор некоторых бак-

терий превышает ширину клетки, и тогда форма ее меняется и приобретает вид веретена или теннисной ракетки, такие бактерии называют кластридиями. Под микроскопом споры имеют вид округлой или овальной формы блестящих зерен.

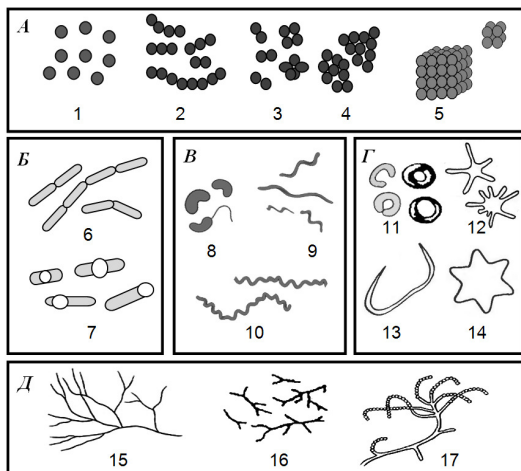


Рис. 3. Формы бактерий:

А – шаровидные: 1 – микрококки, 2 – стрептококки, 3 – диплококки и тетракокки, 4 – стафилококки, 5 – сарцины;
Б – палочковидные: 6 – палочки без спор, 7 – палочки со спорами;
В – извитые: 8 – вибрионы, 9 – спириллы, 10 – спирохеты; Г – редкие формы:
11 – тороиды, 12 – бактерии, образующие простеки, 13 – бактерии червеобразной формы, 14 – бактерии в форме шестиугольной звезды;
Д – актиномицеты: 15 – мицелий, 16 – актиномицеты немиецелиальные, 17 – споры

Когда спора формируется, остатки материнской клетки разрушаются и спора освобождается.

Извитые бактерии различаются по длине и диаметру клетки, числу и степени изогнутости завитков. К извитым формам относятся вибрионы, спириллы и спирохеты. Вибрионы представляют собой слегка изогнутые в виде запятой палочки, спириллы-палочки, образующие от 1 до 5 завитков, спирохеты – длинные и тонкие извитые формы с многочисленными мелкими завитками.

Бактерии размножаются делением клетки пополам. Клетки некоторых бактерий после размножения не отделяются одна от другой, вследствие чего и образуются цепочки или сцепления иной формы.

Существуют и другие более или менее отличающиеся от основных, так называемых истинных, бактерий, к которым относятся нитчатые

бактерии, миксобактерии, почкующиеся или стебельковые бактерии, актиномицеты, рикетсии и микоплазмы.

В последние годы из почвы и других объектов выделены бактерии своеобразной формы (тороидальные, звездоподобные, червеобразные и др., рис. 3).

Морфологические признаки бактерий используют при их классификации.

Контрольные вопросы

1. Как приготовить фиксированный мазок?
2. Какова цель фиксации мазка?
3. Чем отличаются простые и сложные методы окрашивания препаратов?
4. Как приготовить окрашенный мазок по методу Грама?
5. Какие бывают формы клеток у бактерий?
6. Какие бактерии образуют споры и как их обнаружить?
7. Почему одни бактерии по Граму окрашиваются в красный цвет, другие в синий?
8. Чем отличаются грамположительные бактерии от грамотрицательных?

Лабораторная работа № 3 ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ ДРОЖЖЕЙ

Цель занятия: ознакомиться с морфологией дрожжей.

План проведения занятия

Промикроскопировать дрожжи и изучить их морфологию:

- выявить почкующиеся клетки;
- определить полноценность дрожжевой клетки, выявив наличие гликогена и жира;
- определить наличие живых и мертвых клеток в препарате.

Задание 1. Приготовить препарат «раздавленная капля» с исследуемой культуры дрожжей.

Морфология дрожжей исследуется в препарате «раздавленная капля». С помощью этого препарата рассматривают микроорганизмы в живом состоянии.

При исследовании дрожжей, выращенных на плотной среде, небольшая их масса берется охлажденной бактериологической петлей, предварительно прокаленной в пламени спиртовки или газовой горелки, и тщательно размешивается в капле воды, которую наносят на предметное стекло.

Если исследуемые микроорганизмы находятся в жидкой среде, то на предметное стекло наносят каплю этой микробной суспензии (взвеси) без добавления при этом воды или другой жидкости. Суспензию берут стеклянной палочкой или бактериологической петлей.

Дрожжи микроскопируют с объективом-8, затем 40 *при слабо освещенном поле зрения*. Можно микроскопировать их и с объективом-90, используя при этом особо тонкое покровное стекло, на поверхность которого наносят иммерсионное масло.

Задание 2. Изучить морфологию дрожжей. Заполнить табл. 1.

Таблица 1

Морфология дрожжей

Вид дрожжей	Форма клетки	Почкование (рисунок)	Образовавшиеся клетки, %	Наличие гликогена	Наличие жира	Наличие мертвых клеток

1. Рассмотрите и зарисуйте форму дрожжевых клеток и их строение, выявив оболочку, цитоплазму, вакуоли и включения запасных питательных веществ. Цитоплазма видна при микроскопировании как более темная зернистая масса, вакуоли – в виде светлых, прозрачных пятнышек, капли жира – светлые, блестящие (сильно преломляют свет), гликоген – в виде плотных зерен.

2. Понаблюдайте за препаратом несколько минут (3–5 мин). Обратите внимание на отсутствие подвижности дрожжевых клеток. При микроскопировании не следует смешивать самостоятельное движение дрожжей с броуновским движением взвешенных в воде мельчайших частиц. Движение не следует также смешивать с чисто механическим перемещением, когда с током жидкости все частицы передвигаются в одном направлении с одинаковой скоростью.

Найдите и зарисуйте почкующиеся клетки, а у спорообразующих дрожжей клетки со спорами. Посчитайте процент образовавшихся клеток.

Результаты опыта запишите в табл. 1.

3. Определите наличие гликогена и жира в дрожжевых клетках.

Для установления химической природы внутриклеточных включений применяют микрохимические реакции.

Для выявления гликогена на предметное стекло наливают каплю раствора йода в йодистом калии и размешивают в ней петлей жидкую культуру дрожжей, дают постоять 2–3 мин. Препарат накрывают покровным стеклом. После этого рассматривают препарат под микроскопом объективом-40. Наличие в клетке темных зернышек, крапинок и капелек говорит о присутствии гликогена.

Гликоген окрашивается в красно-бурый цвет. Если гликогена в клетках нет или его мало, значит дрожжи незрелые или старые.

Жир можно обнаружить путем добавления к капле дрожжей 0,5% спиртового раствора краски судан-3. Для окраски жира на предметное стекло помещают каплю дрожжевой культуры, приливают каплю раствора судана-3 и дают препарату постоять 2–3 мин, после чего накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом с объективом-40. Под микроскопом цитоплазма клетки бесцветна, а жир – темного цвета.

4. Приготовьте препарат дрожжевых клеток, окрашенный фуксином. Для окраски на предметное стекло поместите каплю дрожжевой культуры, прибавьте каплю фуксина и дайте препарату постоять 1 мин, после чего накройте покровным стеклом и рассмотрите под микроскопом с объективом-40.

Окрашенные клетки дрожжей являются мертвыми. Определите их количество.

5. Приготовьте препарат дрожжей, окрашенный простым способом и промикроскопируйте объективом-90. Выявите клеточные структуры дрожжевой клетки и зарисуйте.

Морфология дрожжей. Дрожжи относятся к классу аскомицетов или сумчатых грибов и представляют собой одноклеточные неподвижные организмы размером в поперечнике от 3 до 5 мкм, длиной от 6 до 10–15 мкм. Форма клеток дрожжей чаще круглая, овально-яйцевидная, эллипсоидальная (*Saccharomyces*). Реже встречаются дрожжи цилиндрические (*Schizosaccharomyces*) и лимонообразные (*Saccharomycodes*) (рис. 4).

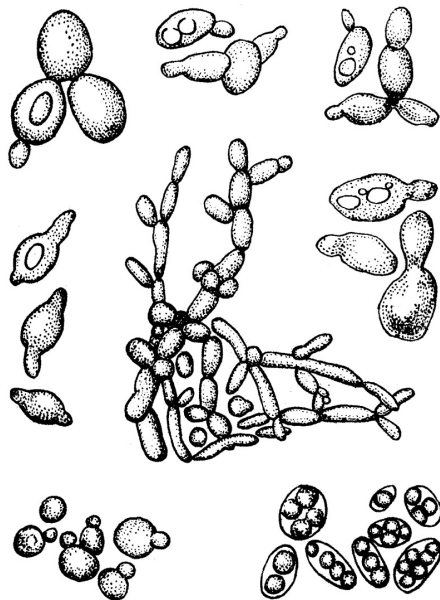


Рис. 4. Форма и размеры дрожжей

Клетка дрожжей состоит из оболочки, цитоплазмы, ядра. Оболочка некоторых дрожжей способна ослизняться. В цитоплазме можно видеть различного рода включения (капельки жира, гликоген и др.). По мере старения клетки в ней появляются вакуоли – полости, наполненные клеточным соком.

Размножаются дрожжи преимущественно путем почкования. На поверхности клеточной стенки появляется бугор-почка, увеличивающаяся в размерах. В этот бугор из материнской клетки переходит часть цитоплазмы и ядра, после чего почка отделяется от материнской клетки и начинает самостоятельное существование. Иногда дочерние клетки не

отрываются от материнской, образуя сростки. Многие дрожжи способны еще и к спорообразованию.

Основной признак аскомицетов – формирование в результате полового процесса сумок, или асков – замкнутых одноклеточных структур, содержащих определенное (четное) число аскоспор.

Самая распространенная и важная группа аскомицетов – дрожжи семейства *Saccharomycetaceae* (сахаромицеты). Типичного мицелия у них нет, а есть лишь одиночные клетки, размножающиеся почкованием или делением. Если такие клетки после почкования не расходятся, то образуется псевдомицелий.

Дрожжи широко распространены на разнообразных субстратах, богатых сахарами: на поверхности плодов и овощей, ягод, в нектаре цветков, на многих пищевых продуктах и т.д.

Развиваясь на средах, содержащих сахара, дрожжи вызывают спиртовое брожение – превращение сахара в этиловый спирт и углекислый газ. Спиртовое брожение лежит в основе целого ряда пищевых производств (хлебопечение, виноделие, пивоварение, а также получение спирта из отходов целлюлозно-бумажной промышленности или мелас-сы).

Среди дрожжей, вызывающих спиртовое брожение, наибольшее значение имеют представители рода *Saccharomyces* (сахаромицес), который объединяет виды, встречающиеся в природе, и «культурные виды», представленные многочисленными производственными расами.

Пекарские дрожжи *Sacch. cerevisiae* не выделяются из природных субстратов и существуют только в культуре. Они представлены несколькими сотнями рас – винными, хлебопекарными, пивными, спиртовыми.

Некоторые виды дрожжей используют для производства кормовых белков (*Candida utilis*). Отдельные виды дрожжей накапливают до 30–40% жира от массы клеток, а также синтезируют витамин D и комплекс витаминов B.

Контрольные вопросы

1. Как приготовить микроскопический препарат дрожжей?
2. Каковы формы, строение и размеры клеток дрожжей?
3. Как размножаются дрожжи?
4. Обладают ли дрожжи подвижностью?
5. Как обнаружить в клетках дрожжей гликоген и жир?

Лабораторная работа № 4 ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Цель занятия: ознакомиться с морфологией грибов и техникой их микроскопического исследования.

План проведения занятия

Промикроскопировать изучаемые грибы. Описать их культуральные и морфологические признаки и определить родовое название грибов.

Задание 1. Промикроскопировать препараты мицелиальных грибов и описать их культуральные и морфологические признаки. Заполнить табл. 2.

Таблица 2

Культуральные и морфологические признаки грибов

Род и класс гриба	Рисунк гриба	Клеточное строение (одноклеточный, многоклеточный), культуральные признаки (окраска мицелия)	Способы размножения (бесполое и половое)	Что вызывает; промышленное применение

Большинство мицелиальных грибов (плесеней), развиваясь на пищевых продуктах, размножаются бесполом путем (оидиями, конидиями, спорангиоспорами), рассеиваются, что может привести к нежелательному заражению ими лаборатории и самих культур. Поэтому на лабораторных занятиях рассматриваются только способы бесполого размножения на примерах грибов – распространенных возбудителей порчи продуктов.

1. Промикроскопируйте готовые препараты мицелиальных грибов сначала с объективом-8 для общего обозрения, а затем с объективом-40. Определите род грибов и запишите их признаки в табл. 2. На рисунках органов размножения грибов дайте обозначение деталей их строения.

2. Приготовьте препараты грибов и опишите их признаки.

Морфологические признаки грибов изучают в препарате «раздавленная капля».

Для его приготовления из культуры грибов берется небольшой комочек мицелия с помощью двух препаровальных игл (иглы, встав-

ленные в деревянные палочки). Мицелий на предметном стекле осторожно расщепляют иглами, стремясь как можно лучше разъединить гифы. В качестве жидкости используется смесь спирта и глицерина.

Микроскопируют препараты сначала с объективом-8, затем 40. Спороношение лучше всего наблюдать, рассматривая более тонкие части колоний при малом увеличении микроскопа в проходящем свете (без осветителя).

Морфология мицелиальных грибов. Мицелий, или грибница, мицелиальных грибов состоит из тонких ветвящихся и переплетающихся нитей, которые называются *гифами*, и органов размножения (иногда они отсутствуют). Длина гиф бывает различной и довольно значительной, толщина – от 10 до 15 *мкм*.

У одноклеточных грибов мицелий представляет собой одну сильно разветвленную клетку. У многоклеточных грибов в гифах имеются поперечные перегородки (рис. 5).

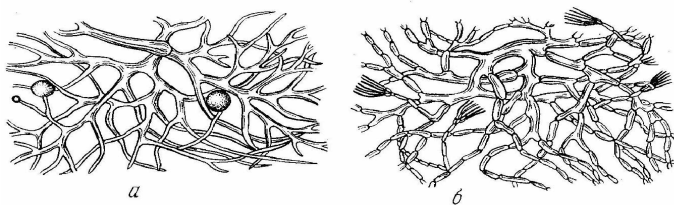


Рис. 5. Мицелий грибов:
а – одноклеточные (неклеточные); *б* – многоклеточные (клеточные)

Грибы нуждаются в кислороде и развиваются обычно на поверхности субстрата (пищевого продукта, специально приготовленной для их выращивания питательной среды и других объектов). Часть своих гиф они внедряют в субстрат и берут из него питательные вещества, другая часть грибницы развивается в воздухе.

Воздушный мицелий грибов может быть в виде различных налетов (пушистых, паутинистых, ватообразных, бархатистых, кожистых), что обусловлено характером сплетения гиф, а иногда их срастанием.

Наблюдается также различная окраска воздушного мицелия. Эти так называемые *культуральные признаки* помогают распознавать грибы, отличать один гриб от другого. Однако основными признаками для характеристики и распознавания грибов служат различия в способах и органах размножения, т.е. *морфологические признаки*.

Некоторые многоклеточные грибы размножаются с помощью особых клеток – оидий. Большинство же грибов размножаются посредством спор, которые образуются как бесполом, так и половым путем (рис. 6).

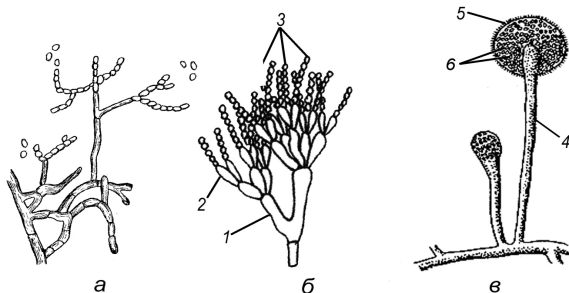


Рис. 6. Органы бесполого размножения грибов:
а – оидии; *б* – конидиеносец (1) со стеригмами (2) и конидиями (3);
в – спорангиеносец (4) со спорангием (5) и спорангиоспорами (6)

Известны различные типы спор, которые отличаются по строению (одноклеточные, многоклеточные), форме, окраске, характеру развития на грибнице (на обычных гифах или специализированных, служащих органами размножения), взаимному расположению (поодиночке или группами).

Ниже дается краткая характеристика мицелиальных грибов, являющихся распространенными возбудителями порчи продуктов или используемых в промышленных производствах.

Класс оомицеты. Мицелий у них хорошо развит, одноклеточный, многоядерный. Бесполое размножение происходит с помощью развивающихся в зооспорангиях зооспор с двумя жгутиками. При половом процессе образуются ооспоры.

Phytophthora infestans (фитофтора), или *картофельный гриб*, поражает клубни и ботву картофеля, а также помидоры и баклажаны (рис. 7).

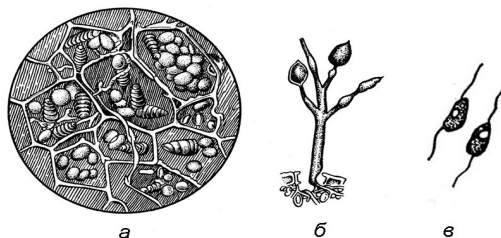


Рис. 7. Фитофтора (*Phytophthora*):
а – спорангиеносец со спорангиями; *б* – прорастающий спорангий; *в* – зооспоры

На коротких разветвленных спорангиеносцах развиваются яйцевидные или лимоновидные спорангии. Во влажной среде в них образуется несколько подвижных зооспор, которые затем прорастают в

гифы. В сухой среде зооспоры не образуются, спорангий непосредственно прорастает в гифу.

Класс зигомицеты. Мукоровые (*Mucoraceae*) грибы. Мицелий у них хорошо развит, неклеточный. Бесполое размножение происходит с помощью неподвижных спорангиоспор; половое – зигоспорами (зиготой). Мукоровые грибы характеризуются разнообразным строением органов бесполого размножения (рис. 8). Многие из них являются возбудителями порчи различных пищевых продуктов. Они развиваются на продуктах в виде пушистой белой или серой массы. Наибольшее значение из мукоровых грибов имеют мукор и ризопус.

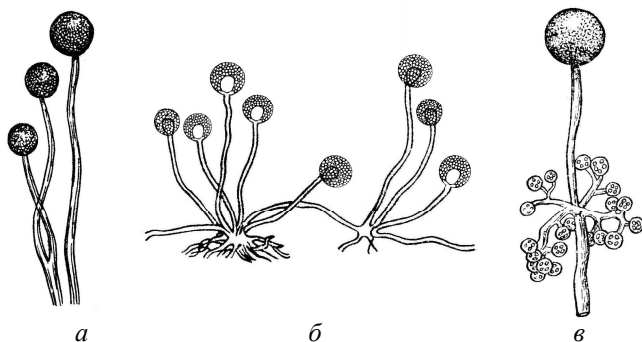


Рис. 8. Спорангиеносцы зигомицетов:
а – *Mucor* (мукор); б – *Rhizopus* (ризопус); в – *Thamnidium* (тамнидиум)

Грибы рода *Mucor* (мукор) имеют крупные спорангии, образующиеся на одиночных, простых или ветвящихся спорангиеносцах (рис. 8, а). Виды этого рода отличаются один от другого по форме и окраске спорангиоспор, по форме зигоспор и т.д. Они поражают плоды и овощи, вызывая их размягчение.

Грибы рода *Rhizopus* (ризопус) образуют неветвящиеся, окрашенные в темно-бурый цвет спорангиеносцы, растущие пучками (кустиками). У основания последних имеются корневидные образования – ризоиды (рис. 8, б), с помощью которых гриб прикрепляется к субстрату. Спорангии крупные, с темноокрашенными спорами имеют вид черных «головочек» на спорангиеносцах, поэтому ризопус получил название «головчатая плесень». Споры имеют чехлики, которые спадают после созревания. Ризопус распространяется по субстрату очень быстро с помощью длинных стелющихся гиф (столонов), напоминающих усы земляники. Поражая плоды, ягоды, овощи, гриб вызывает «мягкую гниль» их – полное разрушение тканей.

У грибов *Thamnidium* (тамнидиум) наряду с крупными многоспоровыми спорангиями имеются еще маленькие спорангии с небольшим

числом спор – спорангиоли (рис. 8, в). Грибы этого рода поражают мясо, чаще баранину.

Некоторые мукоровые грибы имеют и положительное значение благодаря способности продуцировать органические кислоты, ферменты, сбраживать сахар в этиловый спирт. В странах Востока их применяют наряду с дрожжами в производстве алкогольных напитков и при изготовлении специфических продуктов питания, сброженных из бобов сои.

Среди мукоровых грибов существуют возбудители заболеваний человека и животных. Некоторые – паразиты насекомых, их используют для уничтожения вредителей сельскохозяйственных культур.

Класс аскомицеты (*Ascomycetes*) или сумчатые грибы. Мицелий у большинства хорошо развитый, клеточный, у других – представлен одиночными почкующимися клетками. Бесполое размножение мицелиальных аскомицетов происходит с помощью конидий. При половом процессе образуются аскоспоры в сумках (асках). Сумки развиваются у многих грибов в плодовых телах разнообразной формы и строения, характерных для отдельных представителей аскомицетов.

Аскомицеты широко распространены в природе. Среди них много паразитов культурных растений, возбудителей порчи пищевых продуктов, имеются патогенные для животных и человека виды. Некоторые используются в промышленности как продуценты биологически активных веществ (ферментов, витаминов, антибиотиков, алкалоидов).

Грибы рода *Aspergillus* (*аспергиллус*) имеют одноклеточные, неразветвленные конидиеносцы. Верхушки конидиеносцев в большей или меньшей степени вздуты и несут на своей поверхности располагающиеся в один или два яруса стеригмы с цепочкой конидий (рис. 9, а). Конидии различной окраски (зеленоватые, желтые, коричневые), чаще округлые. Конидиеносец по внешнему виду сходен с созревшим одуванчиком. Внутри этих шаровидных тел находятся сумки со спорами.

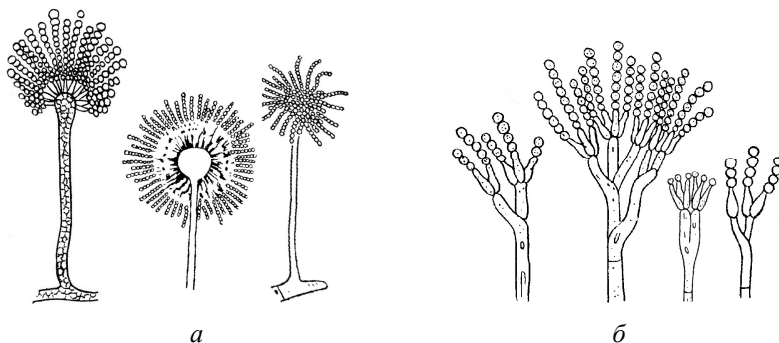


Рис. 9. Конидиеносцы аскомицетов:
а – *Aspergillus* (*аспергиллус*); б – *Penicillium* (*пенициллум*)

У грибов рода *Penicillium* (пенициллиум) конидиеносцы многоклеточные, ветвящиеся. На концах разветвлений конидиеносца располагаются стеригмы с цепочками конидий. Конидии бывают неокрашенными или имеют зеленую, голубую, серо-зеленую окраску. Верхняя часть конидиеносца (рис. 9, б) имеет вид кисточки разной степени сложности, отсюда и название гриба – пенициллиум (кистевик).

Аспергилловые и пеницилловые грибы – распространенные возбудители порчи (плесневения) пищевых продуктов, промышленных изделий и материалов. Некоторые представители их используются в промышленности. Так, *Aspergillus niger* применяется в производстве лимонной кислоты; *Asp. oryzae* и *Asp. awamori* – для получения ферментных препаратов.

Отдельные виды *Penicillium* применяют в производстве лечебного препарата (антибиотика) пенициллина.

Pen. roqueforti играет важную роль в созревании сыра рокфор, *Pen. camemberti* – в производстве сыра камамбер.

Некоторые аспергиллы вызывают заболевания (аспергиллезы) дыхательных путей, кожи, слизистой полости рта человека и животных. Имеются виды, выделяющие ядовитые для животных и человека вещества, – афлатоксины (производные кумаринов), одним из биологических действий которых является образование опухолей.

Sclerotinia (склеротиния) – распространенный и опасный возбудитель белой гнили плодов и овощей при хранении. Как показывает название, для этих грибов характерно в цикле развития образование склероциев на мицелии; конидиальное спороношение отсутствует.

Класс дейтеромицеты. Несовершенные грибы (*Deuteromycetes*). Это грибы с клеточным мицелием, у которых полового спороношения нет или оно еще не обнаружено. Большинство из них размножается конидиями. Конидиеносцы у разных видов грибов отличаются по внешнему виду, располагаются одиночно или группами. Некоторые грибы образуют оидии (артроспоры), имеются формы и без специальных органов размножения. Конидии разнообразны по форме, строению, окраске; они могут быть одноклеточными и многоклеточными.

Наиболее распространенными и опасными возбудителями порчи продуктов следующие.

Botrytis (ботритис) имеет древовидно-разветвленные конидиеносцы, несущие на концах ветвей собранные в головки одноклеточные дымчатого цвета конидии (рис. 10, а). Этот гриб поражает яблоки, груши, многие овощи и особенно ягоды. При этом поверхность их покрывается пушистым серым налетом, ткани становятся водянистыми, буреют, размягчаются. Ботритис вызывает серую гниль моркови. При этом корнеплод размягчается, мокнет, приобретает буроватый цвет. Кроме этого, ботритис вызывает серую гниль капусты, шейковую гниль лука и

мягкую гниль плодов. Некоторые виды используют в виноделии для придания винам особого «букета».

Fusarium (*фузариум*) имеет два типа конидий: макроконидии – серповидно-изогнутые многоклеточные, развивающиеся на коротких разветвленных конидиеносцах (рис. 10, б), и микроконидии – более мелкие эллиптические или округлые одноклеточные (или с одной-двумя перегородками). Мицелий этих грибов белый, бело-розовый, желтоватый. Фузариумы вызывают заболевания различных овощей и плодов, известные под общим названием «фузариоз». Имеются виды, образующие ядовитые для человека вещества.

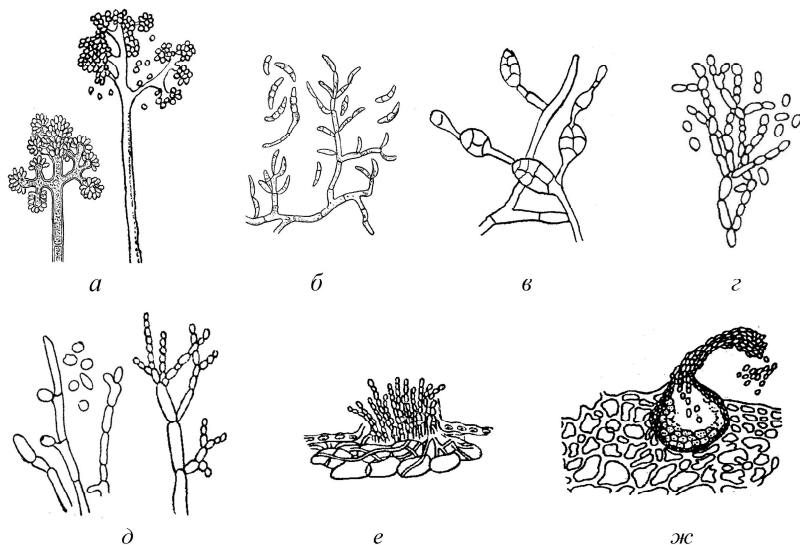


Рис. 10. Несовершенные грибы:

a – *Botrytis* (*ботритис*); *б* – *Fusarium* (*фузариум*); *в* – *Alternaria* (*альтернария*);
г – *Oidium* (*оидиум*); *д* – *Cladosporium* (*кладоспориум*); *е* – *Monilia* (*монилия*);
ж – *Phoma* (*фома*)

Alternaria (*альтернария*) характеризуется наличием многоклеточных темноокрашенных конидий булавовидно-вытянутой формы, сидящих цепочками или одиночно на слабо развитых конидиеносцах (рис. 10, в). Различные виды *Alternaria* широко распространены в почве и на растительных остатках. Гриб вызывает заболевание многих сельскохозяйственных растений (томаты, морковь, капуста, яблоки, citrusовые), называемое *альтернариозом*. Развиваясь на пищевых продуктах, альтернария образует на них черные вдавленные пятна.

Oidium (*оидиум*) образует разветвленный белый мицелий, гифы которого легко распадаются на оидии – артроспоры (рис. 10, г). Один из видов этого рода – *Oidium lactis* (*Geotrichum candidum*) – молочная плесень, часто развивается в виде бархатистой пленки на поверхности квашеных овощей и кисломолочных продуктов при их хранении. Гриб использует находящуюся в этих продуктах молочную кислоту, что приводит к их порче, в молочных продуктах оидиум разлагает белок, жиры. Эта плесень встречается также на прессованных дрожжах, сливочном масле, сыре и других продуктах.

Cladosporium (*кладоспориум*) имеет слабоветвящиеся конидиеносцы, несущие на концах цепочки конидий (рис. 10, д). Конидии бывают разнообразной формы (округлой, овальной, цилиндрической и др.) и размеров, нередко двуклеточными. Мицелий, конидиеносцы и конидии окрашены в оливково-зеленый цвет. Для этих грибов характерно выделение в среду темного пигмента. Кладоспориум нередко обнаруживается при холодильном хранении на различных пищевых продуктах в виде бархатистых темно-оливковых (до черного цвета) пятен.

Monilia (*монилия*) – гриб, не имеющий настоящих конидиеносцев (рис. 10, е). Конидии, соединенные в простые или ветвящиеся цепочки, располагаются на коротких отростках мицелия. Эти грибы являются активными возбудителями порчи плодов. Они вызывают плодовую и коричневую гниль яблок и груш (монилиоз) и серую плодовую гниль косточковых плодов (абрикосов, персиков, вишни).

Phoma (*фома*) имеет короткие конидиеносцы в пикнидах с бесцветными одноклеточными конидиями разнообразной формы (рис. 10, ж). Среди грибов много паразитов растений, а также возбудителей порчи, например фомоза овощей при хранении – ткань плодов становится сухой и трухлявой коричневого цвета. Некоторые грибы этого вида вызывают внутреннее плесневение масла и сердцевидную гниль свеклы, при которой появляются бурые вдавленные пятна.

Контрольные вопросы

1. Каково строение тела мицелиальных грибов?
2. Какие признаки грибов называются культуральными?
3. Как приготовить микроскопический препарат грибов?
4. Каким образом распознают мицелиальные грибы?
5. Назовите типы спор и органы бесполого способа размножения грибов.
6. Приведите примеры грибов, размножающихся оидиями, спорангиоспорами и конидиями.

Лабораторная работа № 5

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Цель занятия: ознакомиться с сущностью и значением микробиологических показателей качества пищевых продуктов.

План проведения занятия

1. Изучить микробиологические требования к оценке качества пищевых продуктов.
2. Ознакомиться с микроорганизмами, характеризующими безопасность пищевых продуктов.

Задание 1. Изучить микробиологические требования к оценке качества пищевых продуктов (количественные и качественные показатели).

Качество пищевых продуктов определяется комплексом органолептических, физико-химических и микробиологических показателей в соответствии с требованиями действующей нормативной документации.

Важнейшими характеристиками продовольственных товаров являются их безопасность и микробиологическая стойкость.

Под *безопасность* понимают отсутствие вредных примесей химической и биологической природы, в том числе патогенных микроорганизмов и ядовитых продуктов их жизнедеятельности.

Понятие «*микробиологическая стойкость*» подразумевает потенциальные возможности сохранения продукта без порчи.

Микрофлора пищевых продуктов представляет собой сложную динамическую систему, связанную с внешней средой. Это значительно осложняет способы ее исследования и трактовку полученных результатов. Для оценки качества пищевых продуктов, а также условий их производства и хранения пользуются количественными и качественными микробиологическими показателями.

Количественные показатели указывают общее число микроорганизмов в 1 г (1 см³) продукта.

Основным количественным тестом является КМАФАнМ продукта.

КМАФАнМ – это количество живых мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в 1 г (1 см³) продукта. В зависимости от вида продукта и способа его изготовления этот показатель может свидетельствовать об общем санитарно-эпидемиологическом состоянии продукта, свежести или начальной стадии порчи внешне доброкачественного продукта, нарушении технологических режимов при производстве, возможности вторичного загрязнения, стойкости при хранении в заданных условиях и позволяет своевременно реализовать продукт. Кроме этого, на основании исследования динамики КМАФАнМ устанавливаются сроки годности новых пищевых продуктов.

Для многих продуктов КМАФАнМ нормируется.

Стойкость пищевых продуктов при хранении оценивают также по количеству мицелиальных грибов, дрожжей, молочнокислых бактерий и специфических для каждого вида продукции возбудителей порчи.

Качественные показатели указывают на отсутствие (присутствие) микробов конкретных видов в определенной массе продукта. Их применяют для характеристики микрофлоры продукта в целях прогнозирования возможных видов его порчи, а также безопасности продукта для здоровья населения.

Прямое выявление в пищевых продуктах патогенных (болезнетворных) или условно-патогенных микробов и их ядов проводится в соответствии с существующими нормативными документами. Обычно проверяют наличие сальмонелл, золотистого стафилококка, листерий, протей. Для ряда пищевых продуктов установлены дополнительные требования – выявление *Cl. botulinum* и их токсинов, *Cl. perfringens*, *Bac. cereus* и др. Согласно техническому регламенту Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» патогенные микроорганизмы и их токсины должны отсутствовать в определенном объеме (массе) материала, подвергнутого исследованиям (25, 50 г и т.д.).

Санитарно-показательные микроорганизмы. Непосредственное выявление патогенных микробов в естественных субстратах, в том числе и в пищевых продуктах, связано с большими трудностями, главным образом из-за их небольшой концентрации. Поэтому кроме прямых методов обнаружения патогенных микроорганизмов, применяют косвенные, позволяющие установить факт загрязнения исследуемых объектов выделениями человека и теплокровных животных. Индикатором такого загрязнения служат так называемые санитарно-показательные микроорганизмы.

Санитарно-показательные микроорганизмы входят в состав нормальной микрофлоры тела человека и животных и с его выделениями поступают во внешнюю среду. Так как подавляющее большинство патогенных микробов попадает во внешнюю среду также с выделениями, то обнаружение на объекте сопутствующих им специфических для этих выделений представителей нормальной микрофлоры тела может служить сигналом санитарного неблагополучия и потенциальной опасности объекта. Например, выявление кишечной палочки и энтерококка – бактерий, специфических для кишечных выделений (фекалий), косвенно указывает на возможность присутствия возбудителей кишечных инфекций (дизентерии, брюшного тифа и др.).

В настоящее время в качестве показателя фекального загрязнения пищевых продуктов и различных объектов окружающей среды используются БКГП.

БКГП – это бактерии группы кишечных палочек. В эту группу, кроме *Escherichia coli*, входят бактерии других родов семейства *Enterobacteriaceae*: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, которые так-

же встречаются в кишечнике человека и теплокровных животных, но в отличие от *E. coli* имеют более широкий ареал распространения. Некоторые виды этих микроорганизмов обитают в почве, воде, на растениях. Истинная (фекальная) кишечная палочка *E. coli* считается показателем свежего фекального загрязнения и отличается от других БГКП своими биохимическими свойствами. Одно из них – способность сбраживать углеводы при повышенной температуре (44–44,5°C).

Содержание БГКП нормировано техническим регламентом Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции».

Допустимое содержание БГКП выражается:

– определенной массой (объемом) продукта, в которой БГКП должны отсутствовать;

– в виде «титра БКПП» (коли-титр) – минимального количества (масса, объем) продукта, в котором могут быть обнаружены эти бактерии.

Выявление БГКП при обследовании предприятий торговли или общественного питания свидетельствует о низком санитарном состоянии объекта.

Задание 2. Изучить микроорганизмы характеризующие безопасность пищевых продуктов, и заполнить табл. 3.

Таблица 3

Характеристика патогенных и условно-патогенных микроорганизмов

Наименование микроорганизмов	Морфологические признаки	Температура развития (оптимальная, минимальная, максимальная)	Устойчивость к воздействию факторов окружающей среды	Источники заражения микроорганизмами (окружающая среда и продукты питания)

На пищевых продуктах встречаются самые разнообразные микроорганизмы. Одни из них вызывают порчу продуктов, другие могут оказаться причиной тяжелых заболеваний.

Выявление патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах говорит об их опасности для организма человека. Ниже дана характеристика наиболее опасным микроорганизмам, которые могут встречаться на пищевых продуктах.

Сальмонеллы – короткие, подвижные, граммотрицательные палочки, не образующие спор, факультативные анаэробы. Оптимум роста 37°C,

но хорошо растут и при 18–20°C. При температуре ниже 4–6°C они, как правило, не растут. Сохраняются при температуре от минус 10 до минус 20°C в течение нескольких месяцев, а также в присутствии 10–12% NaCl, однако содержание поваренной соли 6–8% тормозит размножение сальмонелл. Нагревание до 60°C выдерживают в течение часа, при 100°C погибают моментально, в толще пищевых продуктов, особенно мясных, могут сохраняться даже при длительном (до 3 ч) проваривании. В соленых и копченых продуктах выживают несколько месяцев. Для них неблагоприятна кислая среда (рН ниже 5,0), довольно чувствительны сальмонеллы к УФО и γ -облучению.

Сальмонеллы содержат термостабильный эндотоксин. Основным источником возбудителей являются животные, особенно крупный рогатый скот, водоплавающая домашняя птица, голуби, грызуны, а также больные и бактерионосители.

При кулинарной обработке мясопродуктов, особенно кратковременной (при жарке), некоторые сальмонеллы могут выжить. Оставшиеся в продукте сальмонеллы быстро размножаются при комнатной температуре – значительно быстрее на вареных изделиях, чем на сырых.

Размножение сальмонелл в пищевых продуктах не всегда вызывает органолептические изменения в них. Сальмонеллами нередко бывают заражены тушки и яйца птицы, особенно водоплавающей. Поэтому яйца уток и гусей запрещено использовать для продажи и употреблять при изготовлении мороженого, майонеза и кулинарных изделий.

Сальмонеллезная токсикоинфекция у человека проявляется через несколько часов после употребления зараженной пищи. Острота и длительность заболевания различны. Некоторые из переболевших остаются бактерионосителями.

Листерии – мелкие аэробные полиморфные палочки (иногда кокковидной формы), подвижные, грамположительные, спор и капсул не образуют. Температурный диапазон развития 2,5–60°C, оптимум 30–37°C, могут размножаться при 0°C, не погибают при замораживании. Установлено существование 7 различных видов *Listeria*, из которых *Listeria monocytogenes* – основной возбудитель тяжелых заболеваний человека и очень редко – *Listeria seeligeri*.

Источником заражения листериозом в первую очередь может стать продукция молочной и мясной промышленности, зафиксированы случаи листериоза, связанные с потреблением морепродуктов. Так, в мороженой баранине листерии сохраняются в течение 20 дней, свинине – 14 мес., во льду – 5,5 мес., в крепких соленых растворах, содержащих 30% соли, и температуре 4°C – 2 мес. При варке кусков баранины массой 1–2,5 кг, толщиной 8–10 см они погибают в течение 1 ч; в колбасе мм – через 90 мин. Ингибируют рост *Listeria monocytogenes* кислая среда с рН < 4,7 и коптильная жидкость.

Listeria monocytogenes выделена из многих других пищевых продуктов, в том числе из сырого молока, мороженого, мягкого сыра, рисового супа, мороженых и консервированных омаров, крабов, салатов, разнообразных холодных закусок.

Заболевание характеризуется сепсисом (острым и хроническим), явлениями менингоэнцефалита, который в большом проценте случаев приводит к смертельному исходу. Наряду с тяжелыми клиническими проявлениями встречаются легкие формы болезни и бактерионосительство.

В действующем техническом регламенте Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» отсутствие листерий в нормируемой массе является обязательным требованием при санитарно-гигиенической оценке многих пищевых продуктов (мясных, молочных, морепродуктов, плодоовощных и др.)

Условно-патогенные микроорганизмы. Большинство из них встречаются в составе нормальной микрофлоры кишечника человека и животных, для других природной средой обитания служат почва, а также вода. Объединяет эти микроорганизмы способность интенсивно размножаться в пищевых продуктах, продуцировать токсины и вызывать пищевые отравления.

При пищевых отравлениях, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, большое значение имеют образующиеся в процессе жизнедеятельности микробов неспецифические токсические вещества – мускарин, гистамин, кадаверин, путресцин и др.

Протей – бактерии рода *Proteus* из семейства *Enterobacteriaceae*, мелкая грамотрицательная палочка, очень подвижная, не образующая спор. Диапазон роста 5–43°C, оптимум 25–37°C, факультативный анаэроб, устойчив к посолу (10–12% NaCl). Обитает в кишечнике ряда теплокровных животных и человека, встречается в почве, сточных водах, гниющих белковых продуктах.

Известно пять видов протей, два из них – *P. vulgaris* (рис. 11) и *P. mirabilis* – вырабатывают энтеротоксины (кишечные яды). Чаще всего протей развивается в мясных, рыбных продуктах, особенно измельченных, овощных гарнирах, салатах. Инкубационный период составляет 4–20 ч.

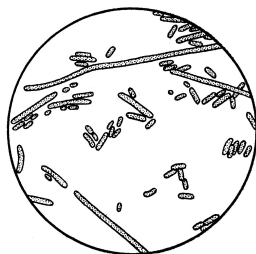


Рис. 11. *Proteus vulgaris*

Энтеропатогенные кишечные палочки относятся к семейству *Enterobacteriaceae* рода *Escherichia*, виду *E. coli*. Бактерии этого вида являются постоянными обитателями кишечника человека и животных. Они выполняют ряд полезных функций: синтез витаминов (К, В и др.) и антимикробных веществ – колицинов, воздействующих на сальмонелл, шигелл и другие патогенные бактерии. В то же время среди кишечных палочек встречаются варианты, способные вызывать острые кишечные заболевания (особенно у детей). Эти бактерии получили название энтеропатогенных кишечных палочек. Они отличаются тем, что содержат термостабильные эндотоксины, а некоторые штаммы образуют и экзотоксины (энтеротоксигенные формы).

Энтеропатогенные кишечные палочки мелкие, подвижные, грам-отрицательные, не образуют спор, факультативные анаэробы (рис. 12). Диапазон роста от 5 до 45°C, оптимум 30–37°C, но хорошо растут и при комнатной температуре. Сбраживают лактозу и ряд других сахаров до кислот и газа, образуют индол. При нагревании до 60°C *E. coli* погибает через 15–20 мин, при 75°C – через 4–5 мин.

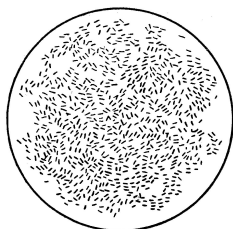


Рис. 12. Кишечная палочка

Энтеропатогенные кишечные палочки попадают в пищевые продукты от больных людей и бактерионосителей. Пищевые токсикоинфекции, вызванные этим микробом, чаще всего связаны с употреблением мясных и молочных продуктов (готовые блюда из рубленого мяса, домашняя протокваша, кефир, творог) и блюд из сырых овощей и фруктов.

Bacillus cereus (бацилла *цереус*) – подвижная, спорообразующая палочка, грамположительная, аэроб. Оптимальная температура развития 30–32°C, минимальная 5–10°C. Бацилла устойчива к высокой концентрации соли (до 10–15%) и сахара (до 40–60%). Споры *Bacillus cereus* термоустойчивы и могут сохраняться в продукте не только при обычной кулинарной обработке, но даже и при стерилизации консервов.

Возбудитель широко распространен во внешней среде, является постоянным обитателем почвы, обнаруживается в различных сухих продуктах (в сухом молоке, яичном порошке, суповых концентратах), на

овошах. Причиной отравления могут служить продукты животного и растительного происхождения, в которых не наблюдаются органолептические изменения даже при накоплении 10^5 – 10^6 клеток *B. cereus* в 1 г продукта. *B. cereus* продуцирует энтеротоксин и ряд других биологически активных веществ. Отравление могут вызвать и образующиеся под влиянием протеолитических ферментов этих бактерий продукты расщепления белка (например, токсичные амины). Инкубационный период – от 4 до 16 ч, длительность заболевания 1–2 сут.

Clostridium perfringens (*перфрингес*) – крупная грамположительная, неподвижная, спорообразующая, анаэробная бактерия. Оптимальная температура роста 37–43°C (крайние границы 6–50°C). Не развивается в кислой среде (рН ниже 3,5–4,0) и в присутствии 10–12% NaCl. Споры выдерживают кипячение в течение 30–60 мин, а у отдельных штаммов – до 6 ч. При обычной кулинарной обработке споры могут сохраняться; не исключено выживание и отдельных вегетативных клеток.

Существуют шесть (А, В, С, Д, Е, F) типов *Cl. perfringens*, каждый из которых играет определенную роль в патологии человека и животных. Различаются они по составу образуемых токсинов. Имеются слабotoксигенные штаммы, есть и не образующие токсина. В основном возникновение пищевых токсикоинфекций вызывает тип А. Этот микроб обитает в кишечнике человека и животных, широко распространен в природе (в почве, воде), обнаруживается на различных пищевых продуктах. Из продуктов животного происхождения наибольшую обсемененность имеют мясо и мясопродукты, а из растительных – мука и крупа.

Streptococcus faecalis, или фекальные стрептококки – энтерококки, представляют собой кокки, расположенные попарно или цепочками. Факультативные анаэробы, спор не образуют. Растут при 10–45°C в бульоне с 6,5% NaCl. Хорошо переносят замораживание и кислую среду, устойчивы к высушиванию. Погибают при 60°C через 30 мин. Энтерококки входят в состав нормальной микрофлоры кишечника человека и теплокровных животных. Обладают антагонистическими свойствами по отношению к возбудителям кишечных инфекций. Отравления могут быть вызваны разными продуктами (студни, салаты, сосиски, отварная рыба, мясо и др.). Обнаружение энтерококков служит одним из критериев фекального загрязнения воды, а также пищевых продуктов.

Vibrio parahaemolyticus (*парагемолитический вибрион*) – очень подвижный грамтрицательный устойчивый к посолу и замораживанию. При минус 18°C сохраняется 19 дней. Нагревание до 80°C переносит в течение 15 мин. Вибрион широко распространен в морской воде, обнаруживается в рыбе, моллюсках, креветках, омарах, устрицах и других обитателях морей и океанов. Впервые вспышки этого заболевания отмечены в 50-х годах в Японии, с тех пор случаи отравления участились. Вибрион продуцирует гемолизин (разрушает эритроциты крови) и энте-

ротоксин. Пищевые токсикоинфекции возникают у лиц, употреблявших в пищу сырую рыбу, моллюски. Описано бактерионосительство, особенно среди работников рыбной промышленности. Существует опасность заноса вибриона с замороженными продуктами (креветками, крилем и др.).

Иерсинии (род *Iersinia* из семейства *Enterobacteriaceae*) – овалы или палочковидные клетки, грамотрицательные, подвижные, спор не образуют, факультативные анаэробы. Растут в диапазоне от минус 2 до 45°C, оптимум 30–37°C. Переносят замораживание при минус 15 – минус 25°C; при 60°C погибают через 30 мин, а при 100°C – через 30–40 с.

Пищевые токсикоинфекции вызывают два вида этих бактерий, образующих эндотоксин: *I. pseudotuberculosis* и *I. enterocolitica*.

I. pseudotuberculosis – неприхотливые бактерии, обладающие широким диапазоном адапционных свойств. Они могут длительно существовать и размножаться в условиях охлаждаемых хранилищ на свежих и особенно квашеных овощах. За способность размножаться при низкой температуре эти бактерии называют «микробы из холодильника». Иерсинии распространяются грызунами, загрязняющими пищевые продукты на предприятиях пищевой промышленности, торговли и общественного питания. В естественных условиях возбудитель существует как паразит многих млекопитающих и птиц.

I. enterocolitica – паразит диких и домашних животных (свиней, коров, кур, индюков и др.). Пищевые продукты инфицируются первично (мясо, молоко от больных животных) и вторично – грызунами, загрязненной водой, с оборудования. Заболевание протекает как инфекция или как пищевое отравление.

Золотистые стафилококки – грамположительные, факультативные анаэробы. Диапазон роста и токсинообразования от 6 до 45°C, оптимум 30–37°C. Интенсивно размножаются при комнатной температуре (18–20°C). Образуют пигмент – липохром золотистого цвета. Устойчивы к высушиванию, замораживанию, действию солнечного света и химических веществ. Могут развиваться в пищевых продуктах при концентрации NaCl 10–15% и высоком содержании сахара – до 50%. Прогревание при 70°C выдерживают в течение часа, при 80°C погибают через 20–40 мин. Описано шесть типов энтеротоксина.

Наиболее частой причиной пищевых интоксикаций считается энтеротоксин А, весьма устойчивый к нагреванию. Для его полного разрушения необходимо кипячение около 2 ч или 30-минутное прогревание при 120°C. Основным источником заражения пищевых продуктов энтеротоксигенными стафилококками служат люди, страдающие гнойничковыми заболеваниями кожи, или носители. Распространение возбудителя происходит воздушно-капельным, воздушно-пылевым и контактным путями. Иногда энтеротоксигенный стафилококк попадает в пищу от больных животных, например в молоко – от коров, страдающих стафилококковым воспалением вымени (маститом). При комнатной темпе-

ратуре токсины накапливаются в молоке, салатах уже через 6–10 ч, а при 35–37°C – через 2–5 ч.

Причиной отравления могут послужить различные продукты (мясные, рыбные, кулинарные изделия, кондитерские, особенно с заварным кремом, сметана, творог и др.). Пищевые продукты, пораженные стафилококками, обычно не имеют внешних признаков порчи. Инкубационный период от 30 мин до 6 ч. Типичные симптомы: рвота, боли в области живота, сердечная слабость. Профилактика отравлений: отстранение от работы с пищевыми продуктами людей с гнойничковыми поражениями кожи, заболеваниями носоглотки и верхних дыхательных путей, создание условий, исключающих размножение стафилококков и накопление образуемых ими токсинов.

Clostridium botulinum вызывает тяжелое пищевое отравление токсином – ботулизм (от лат. *botulus* – колбаса). Это крупные, подвижные, грамположительные палочки, образующие субтерминально расположенные споры, превышающие поперечник клетки, что придает им вид теннисной ракетки (рис. 13). Клостридии ботулизма – строгие анаэробы, оптимальная температура роста 30–37°C. Не развиваются и не продуцируют токсин при pH ниже 4,0, при температуре ниже 4–5°C, содержании NaCl 6–10% (в зависимости от температуры). Вегетативные клетки погибают при 80°C через 30 мин; споры выдерживают кипячение до 6 ч, прогревание при 105°C – 1–2 ч, при 120°C – до 25 мин. В больших кусках мяса, банках большой вместимости споры могут оставаться жизнеспособными и после автоклавирования. В замороженных пищевых продуктах споры сохраняют способность прорасти в течение нескольких месяцев. Клостридии ботулизма продуцируют экзотоксин (нейротоксин) – наиболее сильный из всех известных микробных и химических ядов. Экзотоксин устойчив к действию соляной кислоты желудочного сока, кипячению в течение 10–15 мин, а также замораживанию продуктов, маринованию, посолу, копчению. В консервах экзотоксин может сохраняться несколько месяцев.

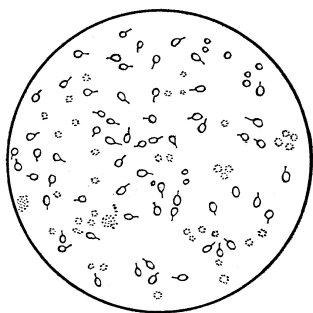


Рис. 13. *Clostridium botulinum*

Попадая с пищей в кишечник, токсин всасывается в кровь и поражает центральную нервную и сердечно-сосудистую системы.

Инкубационный период чаще 12–24 ч, но может быть и короче (2–6 ч) и длительнее (несколько суток). Основные признаки заболевания: расстройство зрения, речи, параличи, дыхательная недостаточность. Смертность от ботулизма довольно высокая. Только раннее введение лечебной антитоксической сыворотки позволяет добиться благоприятного исхода болезни.

Возбудитель ботулизма широко распространен в природе: в почве, воде, придонном иле, кишечнике рыб (особенно осетровых), теплокровных животных и птиц. Продукты, послужившие причиной отравления, различны: чаще всего это растительные консервы, особенно с низкой кислотностью, сырокопченые окорока, мясные и рыбные слабозасоленные, вяленые и копченые изделия, в большинстве случаев приготовленные в бытовых условиях или упакованные с вакуумированием. Развитие микроба и накопление токсических веществ могут происходить «гнездно» – в виде очагов в толще продуктов, где создаются анаэробные условия. Этим объясняются единичные случаи отравления при употреблении одной и той же пищи многими лицами.

При размножении возбудителя обычно не наблюдаются органолептические изменения продукта; лишь в некоторых случаях отмечаются бомбаж банок консервов, запах сыра и прогорклого масла.

Основные мероприятия по предупреждению ботулизма: защита сыра от попадания на него возбудителя, соблюдение режима стерилизации и хранения консервов, выполнение санитарно-технологических требований при вылове, обработке, копчении и солении рыбы.

За последнее время усилилась опасность отравления, обусловленная *Cl. botulinum*, в связи с расширением использования продуктов, хранящихся в пленках под вакуумом и в газовых смесях.

Контрольные вопросы

1. По каким микробиологическим показателям оценивается безопасность пищевых продуктов?
2. Что такое БГКП и КМАФАнМ? Для чего они определяются?
3. Какие микроорганизмы относятся к условно-патогенным и санитарно-показательным?

Лабораторная работа № 6

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ СВЕЖЕСТИ МЯСА И РЫБЫ БАКТЕРИОСКОПИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Цель занятия: оценить степень свежести исследуемых образцов мяса и рыбы.

План проведения занятия

Приготовить из исследуемых образцов мяса и рыбы препараты-отпечатки, окрашенные по Граму, и дать им оценку.

Задание 1. Изучить методы оценки степени свежести мяса и рыбы.

Оценка качества мяса и рыбы производится на основе показателей, одним из которых является ориентировочная оценка количественного и качественного состава микрофлоры бактериоскопическим методом.

Сущность метода состоит в том, что из образца мяса и рыбы вырезают кусочки и к срезанным сторонам их прикладывают предметные стекла. Полученные препараты-отпечатки после подсушивания и фиксации окрашивают по Граму и микроскопируют.

Окраска по Граму применяется в целях обнаружения возможного присутствия БГКП, которые являются грамтрицательными беспоровыми палочками.

Проникновение бактерий в толщу мяса свидетельствует о снижении его качества. Количественный учет микроорганизмов производят из расчета на одно поле зрения препарата-отпечатка.

В соответствии с ГОСТ 23392-78 «Мясо. Методы химического и микроскопического анализа свежести» результаты бактериоскопического исследования мяса оцениваются следующим образом (табл. 4).

Таблица 4

Характеристика степени свежести мяса

Степень свежести мяса	Показатели бактериоскопической пробы (в поле зрения микроскопа)
Свежее	Микроорганизмы не обнаруживаются или имеются лишь единичные (до 10 клеток) кокки и палочки. Следов распада мышечной ткани нет
Сомнительная свежесть	Обнаруживается не более 30 кокков или палочек, а также следы распада мышечной ткани; ядра мышечных волокон в состоянии распада, исчерченность волокон слабо различима
Несвежее	Обнаруживается свыше 30 кокков или палочек. Наблюдается значительный распад мышечной ткани: почти полное исчезновение ядер и полное исчезновение исчерченности мышечных волокон

Результаты санитарной оценки свежести рыбы бактериоскопическим методом оцениваются путем микроскопирования мазков-отпечатков с поверхности тела рыбы и с глубоких слоев мышц (табл. 5). Если результаты бактериоскопического исследования превышают указанные пределы, то рыба считается непригодной для использования в пищевой промышленности.

Таблица 5

Характеристика степени свежести рыбы

Степень свежести рыбы	Показатели бактериоскопической пробы (в поле зрения микроскопа)	
	поверхность рыбы	ткани мышц
Свежая	Единичные клетки (палочки и кокки)	Микроорганизмы должны отсутствовать
Задержанная в хранении, но пригодная для пищевого использования	10–30 клеток (палочки и кокки)	Единичные клетки

Кроме бактериоскопического метода при оценке качества мяса, мясопродуктов, рыбы и рыбопродуктов проводятся микробиологические исследования, предусмотренные техническим регламентом Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции».

Задание 2. Изучить требования нормативных документов к микробиологическим показателям исследуемых продуктов питания.

Изучите требования действующей нормативной документации к микробиологическим показателям исследуемых продуктов питания.

Задание 3. Приготовить из исследуемых образцов мяса и рыбы препараты-отпечатки, окрашенные по Граму, и оценить их степень свежести.

Приготовьте мазки-отпечатки для бактериоскопического анализа следующим способом.

Чистое предметное стекло плотно прижмите к исследуемому образцу продукта на несколько секунд. Полученный препарат-отпечаток высушите на воздухе, зафиксируйте пламенем горелки и окрасьте его по Граму. Если мясо или рыба жирные, то препарат-отпечаток фиксируется смесью спирта с эфиром.

Микроскопируйте окрашенный препарат, применяя объектив-90. Просмотрите препарат не менее чем в 10 полях зрения. Кокки и палочки

посчитайте отдельно и выведите (приблизенно) их среднее число на одно поле зрения.

Оцените свежесть продуктов по полученным результатам исследования, сопоставив с приведенными показателями их качества (табл. 4–5).

Отметьте отношение обнаруженных бактерий к окраске по Граму. Результаты опыта запишите, сделайте рисунок.

Контрольные вопросы

1. Какова сущность и значение бактериоскопического метода исследования пищевых продуктов?
2. Как оценивается качество мяса и рыбы на основании их бактериоскопического исследования?
3. Зачем производят окраску по Граму препарата-отпечатка при исследовании мяса и рыбы?

Лабораторная работа № 7

МОЛОЧНОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ И ЕГО ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Цель занятия: изучить микробиологию кисломолочных продуктов.

План проведения занятия

Ознакомиться с возбудителями молочнокислого брожения и микрофлорой кисломолочных продуктов питания.

Задание 1. Изучить характеристику возбудителей молочнокислого брожения и заполнить табл. 6.

Таблица 6

Характеристика возбудителей молочнокислого брожения

Наименование микроорганизмов	Форма	Отношение к окраске по Граму	Способность к спорообразованию	Температура развития (оптимальная, минимальная, максимальная)
<i>Гомоферментативные</i>				
<i>Гетероферментативные</i>				

Молочнокислое брожение – это превращение сахара молочнокислыми бактериями в молочную кислоту. Наряду с этим основным продуктом брожения в большем или меньшем количестве образуются побочные продукты.

По характеру брожения различают две группы молочнокислых бактерий: гомоферментативные и гетероферментативные.

Гомоферментативные (однотипно-бродящие) бактерии образуют в основном молочную кислоту (не менее 85-90%) и очень мало побочных продуктов. Этот тип молочнокислого брожения можно представить следующим общим уравнением:



Гетероферментативные (разнотипно-бродящие) бактерии – менее активные кислотообразователи. Наряду с молочной кислотой они образуют значительное количество других веществ – этиловый спирт, углекислый газ, уксусную кислоту; есть и такие, которые продуцируют и четырехуглеродные соединения – ацетоин ($\text{CH}_3\text{CHONCOCH}_3$) и диацетил ($\text{CH}_3\text{COCOCH}_3$), обладающий своеобразным приятным ароматом.

В зависимости от условий развития (рН, температуры, степени аэробности и др.) характер конечных продуктов брожения может меняться у одного и того же вида молочнокислых бактерий.

Возбудители молочнокислого брожения. Молочнокислые бактерии имеют круглую, слегка овальную или палочковидную форму. Диаметр кокков варьируется у отдельных видов от 0,5 до 1,5 мкм. Кокки располагаются попарно или цепочками (стрептококки) различной длины. Размеры палочковидных бактерий колеблются от 1 до 8 мкм. Клетки одиночные или объединенные в цепочки.

Все молочнокислые бактерии неподвижны, не образуют спор, грамположительны, не имеют фермента каталазы, являются факультативными анаэробами, есть микроаэрофилы. Палочковидные бактерии в большей степени, чем стрептококки, предпочитают анаэробные условия.

Различные виды молочнокислых бактерий образуют неодинаковое количество кислоты, что обусловлено различной их кислотоустойчивостью. Преобладающее большинство гомоферментативных палочковидных бактерий продуцируют кислоты больше (до 2–3,5%), чем стрептококки (около 1%). Поэтому палочковидные молочные бактерии могут развиваться при рН 3,8–4,0; кокковые формы при такой кислотности среды не развиваются. Наилучшая бродильная активность палочковидных бактерий проявляется при рН 5,5–6,0.

Большинство молочнокислых бактерий, особенно гомоферментативные палочковидные, очень требовательны к составу питательной среды и хорошо развиваются только при наличии аминокислот или еще более сложных органических соединений азота. Большинство нуждаются и в витаминах (в частности В₁, В₂, В₆, РР, пантотеновой и фолиевой кислотах). Поэтому выращивают молочнокислые бактерии на сложных питательных средах.

Благодаря высокой чувствительности к отдельным аминокислотам и витаминам молочнокислые бактерии используют в качестве «живых реактивов» при определении содержания этих веществ в различных субстратах.

Молочнокислые бактерии легко переносят высушивание, устойчивы к CO_2 и этиловому спирту; многие виды существуют при содержании в среде до 10–15% и более спирта. Некоторые молочнокислые бактерии устойчивы к NaCl, выдерживая концентрацию до 7–10%.

По отношению к температуре молочнокислые бактерии подразделяют на *мезофильные* – с оптимумом роста 25–35°C и *термофильные* – около 40–45°C. Отдельные молочнокислые бактерии холодоустойчивы (*психрофилы*) и могут развиваться при относительно низких положительных температурах (5°C и ниже). При нагревании до 60–80°C они гибнут в течение 30–10 мин, но имеются и термоустойчивые формы, сохраняющиеся при нагревании до 85°C в течение нескольких минут.

Молочнокислые мезофильные бактерии довольно хорошо переносят замораживание, при этом стрептококки более устойчивы, чем палочковидные формы. Некоторые молочнокислые бактерии образуют слизь, при их развитии жидкие субстраты становятся тягучими.

Установлено, что проявляемые молочнокислыми бактериями антагонистические свойства по отношению ко многим сапрофитным и болезнетворным бактериям (возбудителям кишечных заболеваний, стафилококкам) обусловлены не только продуцированием кислот, но и выделяемыми ими специфическими антибиотическими веществами.

В природных условиях молочнокислые бактерии встречаются на различных растениях, разлагающихся растительных остатках, многих пищевых продуктах (плодах, овощах, в молоке, квашеной капусте и др.). В больших количествах обнаруживаются они в желудочно-кишечном тракте животных и человека. Кишечные кокковые формы называют энтерококками или фекальными стрептококками.

Кокковые формы молочнокислых бактерий относятся к семейству *Streptococcaceae*, родам *Streptococcus* и *Pediococcus* (гомоферментативные) и *Leuconostoc* (гетероферментативные), а палочковидные формы – к семейству *Lactobacillaceae*, роду *Lactobacillus*.

Наиболее важными в техническом отношении представителями *гомоферментативных молочнокислых бактерий* являются следующие.

Молочнокислый стрептококк (*Streptococcus lactis*) – кокки, соединенные попарно или короткими цепочками (рис. 14, а). Это мезофиллы, при температуре 25–30°C молоко свертывается через 10–12 ч. В среде накапливают до 1% кислоты. Минимальная температура развития 10°C, максимальная – от 40 до 45°C. Некоторые образуют антибиотик низин.

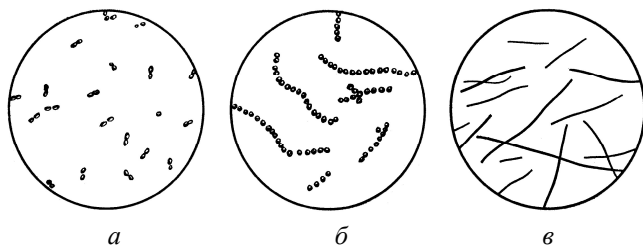


Рис. 14. Молочнокислые бактерии:
а – *Streptococcus lactis*; б – *Streptococcus thermophilus*; в – *Lactobacillus acidophilus*

Близкий по своим свойствам к *S. lactis* его подвида *S. lactis subsp. diacetilactis* способен, кроме сахаров, сбраживать соли лимонной кислоты с образованием ацетона и диацетила, что обуславливает ароматичность продуктов, в которых развивается этот стрептококк.

Сливочный стрептококк (S. cremoris) – сферические клетки, образующие длинные цепочки. Этот мезофильный стрептококк – неактивный кислотообразователь. Лучше растет при 25°C; минимальная температура развития 10°C, максимальная 36–39°C. Некоторые штаммы вырабатывают антибиотик диплококцин.

Термофильный стрептококк (S. thermophilus) – длинные цепочки кокков (рис. 14, б), хорошо развивается при 40–45°C; минимальная температура роста 15°C.

Эти виды молочнокислых стрептококков широко используются при приготовлении разнообразных кисломолочных продуктов.

Болгарская палочка (Lactobacillus bulgaricus) – крупные термофильные палочки, часто образующие длинные цепочки. Они не сбраживают сахарозу, оптимальная температура развития 40–45°C, минимальная 20°C. Это активный кислотообразователь, накапливающий в молоке 2,5–3,5% молочной кислоты.

Болгарская палочка вырабатывает антибиотические вещества, подавляющие гнилостную микрофлору кишечника.

Используется при изготовлении южной простокваши (мацони), кумыса.

Ацидофильная палочка (L. acidophilus) – термофильная бактерия (рис. 14, в). Температурный оптимум роста 37–40°C, минимум около 20°C. При сквашивании в молоке накапливается до 2,2% кислоты. Некоторые способны к слизиобразованию. Используется в производстве ацидофильных кисломолочных продуктов.

Ацидофильные палочки способны приживаться в кишечнике человека, вырабатывают антибиотические вещества, активные в отношении возбудителей кишечных заболеваний и туберкулеза. Из чистых культур ацидофильных бактерий изготавливают биопрепараты, применяемые в медицинской практике и в животноводстве для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний.

Дельбрюковская палочка (L. delbrueckii) – зерновая термофильная палочка, встречается поодиночке и цепочками. Не сбраживает лактозу, поэтому в молоке не развивается. Образует в субстрате до 3,5% кислоты. Применяется в производстве молочной кислоты и в хлебопечении.

Молочнокислая мезофильная палочка (L. plantarum) – небольшие палочки, часто сцепленные попарно или цепочкой. Температурный оптимум около 30°C. Накапливают до 1,3% кислоты. Это основной возбудитель брожения при квашении овощей и силосовании кормов.

Из гетероферментативных молочнокислых бактерий к технически важным следует отнести следующие.

Lactobacillus brevis – палочковидные бактерии, сбраживающие сахара при квашении капусты и огурцов с образованием кислот (молочной и уксусной), этилового спирта и CO₂.

Leuconostoc cremoris – удлиненные кокки одиночные, парные или короткоцепочечные. При сбраживании лимонной кислоты образуют диацетил. Температурный оптимум 20–25°C. Этот лейконосток вводится в закваски для аромата продуктов.

Некоторые виды *Leuconostoc* являются активными слизиобразователями. В субстратах, содержащих сахарозу, образует много «клеякого» полисахарида декстрана; при этом субстрат приобретает густую слизистую консистенцию.

Нетипичное (гетероферментативное) молочнокислое брожение осуществляют также бактерии рода *Bifidobacterium* (*бифидобактерии*).

Бифидобактерии относятся к актиномицетам (ранее их относили к молочнокислым бактериям). Они сбраживают глюкозу с образованием молочной и уксусной кислот. Это прямые или разветвленные палочки, не образующие спор, неподвижные, строгие анаэробы.

Бифидобактерии – обитатели кишечника человека и животных (рис. 15). Они способны продуцировать органические кислоты и антибиотические вещества и являются антагонистами гнилостной и болезнетворной кишечной микрофлоры человека.

В настоящее время известно около 29 видов бифидобактерий, десять из них обнаружены у человека. В кишечнике человека наиболее часто встречаются виды: *Bifidobacterium infantis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. species*.

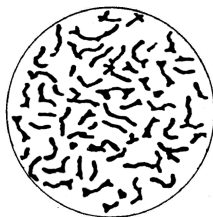


Рис. 15. *Bifidobacterium Adolescentis*

Практическое значение молочнокислого брожения. Молочнокислые бактерии широко применяются в различных отраслях промышленности, но особенно велика их роль в молочной промышленности.

Большое значение эти бактерии имеют при квашении овощей, силосовании кормов (растительной массы) для животных, в хлебопечении, особенно при изготовлении ржаного хлеба. Положительные результаты дают

исследования по использованию молочнокислых бактерий при изготовлении некоторых сортов колбас, солено-вареных мясных изделий, а также при созревании слабосоленой рыбы для ускорения процесса и придания продуктам новых ценных качеств (вкуса, аромата, консистенции и др.).

Промышленное значение имеет также применение молочнокислых бактерий для получения молочной кислоты, которую используют в консервной, кондитерской промышленности и в производстве безалкогольных напитков.

Спонтанно (самопроизвольно) возникающее молочнокислое брожение в продуктах (молоке, вине, пиве, безалкогольных напитках и др.) приводит к их порче (прокисанию, помутнению, ослизнению).

Задание 2. Изучить микрофлору кисломолочных продуктов питания и заполнить табл. 7.

Таблица 7

Характеристика микрофлоры кисломолочных продуктов питания

Кисломолочный продукт	Микроорганизмы, входящие в закваску	Дефекты, возникаемые в продукте при хранении, их возбудители

Кисломолочные продукты играют большую роль в питании человека, так как кроме пищевой ценности имеют диетическое, а некоторые – и лечебное значение.

По сравнению с молоком, кисломолочные продукты обладают повышенной стойкостью при хранении. Кроме того, они являются неблагоприятной средой для развития многих патогенных бактерий. Это обусловлено их повышенной кислотностью и наличием антибиотических веществ, вырабатываемых некоторыми молочнокислыми бактериями.

Качество и специфические свойства кисломолочных продуктов во многом зависят от направленности и интенсивности протекающих при их выработке микробиологических процессов. Решающее значение имеет нормальное течение молочнокислого брожения.

Применение заквасок микроорганизмов с известной биохимической активностью позволяет получить продукт с определенными химическими и органолептическими свойствами, избежать развития случайных микроорганизмов, нарушающих нормальное течение молочнокислого брожения, и обеспечить высокое качество готовой продукции. Для каждого

вида продукта установлен определенный режим технологии его производства, который тесно увязан со свойствами заквасочной микрофлоры.

Простокваша обыкновенная, сметана, творог. В состав этих кисломолочных продуктов входят мезофильные гомоферментативные молочнокислые стрептококки (*Streptococcus lactis*, *S. cremoris*) и ароматобразующие стрептококки (*S. lactis subsp. diacetylactis*).

При изготовлении творога кроме закваски применяют сычужный фермент, который активизирует процесс. Творог иногда вырабатывают из непастеризованного молока. Такой творог предназначен только для изготовления изделий, подвергающихся перед употреблением термической обработке, так как в нем возможно размножение возбудителей пищевой интоксикации – стафилококков, находящихся обычно в сыром молоке.

При производстве **Любительской сметаны** используют смесь мезофильного стрептококка (*S. lactis*) и термофильного (*S. thermophilus*).

Свежевыработанные сметану, творог, жидкие кисломолочные продукты (кроме термизированных) при реализации в торговой сети не разрешается хранить более 72 ч (с момента выработки) при температуре не выше (4±2)°С.

При более длительном хранении в этих продуктах могут развиваться психротрофные дрожжи, бактерии родов *Pseudomonas* и *Alcaligenes*, плесени – микроорганизмы, попадающие в продукт извне (с производственного оборудования, рук и одежды рабочих, из воздуха). При этом возникают дефекты вкуса и запаха продуктов, а также другие виды порчи.

При развитии дрожжей, сбраживающих молочный сахар, может происходить вспучивание продукта (за счет газообразования) и проявляться спиртовой привкус. Многие дрожжи обладают липолитической активностью – развитие их приводит к прогорканию. Одним из распространенных дефектов сметаны является излишняя кислотность, обусловленная развитием термофильных молочнокислых палочек незаквасочного происхождения.

Творог нередко ослизняется в результате развития слизеобразующих молочнокислых стрептококков. Среди плесеней основным возбудителем порчи сметаны и творога является молочная плесень (*Geotrichum candidum*), растущая на поверхности продукта в виде толстой, бархатистой пленки кремового цвета. При этом ощущается прогорклость продукта, посторонний неприятный запах.

Южная и болгарская простокваша (йогурт). Для изготовления этих простокваш используют симбиотическую закваску, содержащую термофильный молочнокислый стрептококк (*S. thermophilus*) и болгарскую палочку (*Lactobacillus bulgaricus*). Болгарская палочка обогащает аромат простокваша, а термофильный стрептококк смягчает ее вкус. Болгарская палочка вырабатывает антибиотические вещества, подавляющие гнилостную микрофлору кишечника. Болгарская палочка так

же, как и ацидофильная, – активные кислотообразователи, поэтому при допустимом кратковременном хранении этих кисломолочных продуктов развитие в них психротрофных бактерий рода *Pseudomonas* – возбудителей порчи – затруднено.

Техническим регламентом Таможенного союза ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции» определяется количество живых клеток в йогурте и сметане на конец срока годности. Оно должно быть не менее 10^7 КОЕ в 1 г.

Ацидофильная простокваша – продукт, близкий к болгарской простокваше, но в состав закваски кроме термофильного молочнокислого стрептококка входит ацидофильная палочка (*Lactobacillus acidophilus*). Для получения необходимой консистенции продукта используют слизеобразующие и не образующие слизи расы ацидофильной палочки.

Ацидофильное молоко и ацидофильную пасту готовят на закваске ацидофильной палочки в определенном соотношении слизистых и неслизистых рас.

Для *ацидофилина* применяют смесь трех заквасок: закваски ацидофильной палочки, закваски для творога и кефирной закваски в соотношении 1:1:1.

Ацидофильные продукты имеют лечебное значение. Ацидофильная палочка способна приживаться в кишечнике. Она вырабатывает вещества, подавляющие развитие туберкулезных, многих гнилостных бактерий и возбудителей кишечных инфекций.

Кефир. При изготовлении кефира используют не чистые культуры микроорганизмов, а естественную симбиотическую кефирную закваску – пастеризованное молоко, сквашенное кефирным грибом.

Кефирный грибок внешне похож на миниатюрную головку цветной капусты; размеры его от 1–2 мм до 3–6 см и более. Микрофлора грибка разнообразна. При микроскопировании выявляется тесное переплетение палочковидных гетероферментативных молочнокислых бактерий, которые образуют как бы остов (строму), удерживающий другие бактерии, преимущественно мезофильные и термофильные молочнокислые бактерии, уксуснокислые, дрожжи.

Основная роль в процессе сквашивания и созревания кефира принадлежит мезофильным молочнокислым стрептококкам. Некоторое значение имеют дрожжи и уксуснокислые бактерии. Последние, как и дрожжи, повышают активность молочнокислых бактерий и придают продукту специфические вкус и аромат.

Кефир является, таким образом, продуктом комбинированного (смешанного) брожения: молочнокислого и спиртового. Содержание спирта может достигать до 0,2–0,6% (в зависимости от длительности созревания), образующийся углекислый газ придает продукту осве-

жающий вкус. Выпускаемый промышленностью кефир массового потребления содержит алкоголя очень мало – сотые доли процента.

Японскими учеными установлено, что в кефирных грибах содержится полисахарид (кефиран), оказывающий противоопухолевое действие.

В кефире иногда появляется запах сероводорода; вызывают его, по-видимому, гнилостные бактерии. Пороком является образование «глазков» и вкуса брожения, что связано с излишним развитием дрожжей и ароматобразующих бактерий – компонентов кефирного грибка.

Кумыс готовят из кобыльего молока. Приготовление кумыса так же, как и кефира, основано на молочнокислом и спиртовом брожении.

Кобылье молоко отличается от коровьего более высоким содержанием лактозы, растворенных азотистых соединений и витаминов, особенно витамина С, но в нем меньше жира. При сквашивании кобыльего молока казеин выпадает в виде очень мелких хлопьев. В состав закваски входят дрожжи, болгарская и ацидофильная палочки, сбраживающие лактозу и обладающие антибиотической активностью. Спиртовое брожение протекает активно; количество спирта достигает 2–2,5%. В настоящее время кумыс готовят и из коровьего молока, такой кисломолочный напиток называется кумысным продуктом. В зависимости от продолжительности сквашивания и степени созревания получают кумыс разной степени кислотности и с различным содержанием спирта.

Ряженку готовят, используя закваску, состоящую из термофильного молочнокислого стрептококка с добавлением или без добавления небольшого количества болгарской палочки. Ее вырабатывают из топленого молока с добавлением молочных продуктов или без их добавления. Молоко перед заквашиванием нагревают до 95°C в течение 2–3 ч, в результате чего она приобретает вкус и цвет топленого молока.

Имеются и другие кисломолочные продукты, которые изготавливают на естественных заквасках – молоко заквашивают сгустком (остатком) предыдущей выработки. В этом сгустке находятся активные молочнокислые бактерии, часто еще и дрожжи. Примером таких продуктов могут служить различные национальные молочнокислые напитки, например чал, мацони, курунга, айран.

Обнаружение посторонней микрофлоры проводится методом микробиологического анализа.

Задание 3. Ознакомиться с понятиями: пробиотики, пребиотики и синбиотики.

В последние годы получило развитие новое направление – создание кисломолочных продуктов функционального назначения, способствующих поддержанию и восстановлению микробной экологии человека, в особенности микрофлоры желудочно-кишечного тракта.

По международной классификации в зависимости от способа восстановления микрофлоры человека принято различать продукты: пробиотические, пребиотические и синбиотические.

Пробиотические – содержат в своем составе пробиотики – полезные для человека непатогенные и нетоксикогенные живые микроорганизмы, обеспечивающие при систематическом употреблении в пищу благоприятное воздействие на организм человека в результате нормализации состава и (или) повышения биологической активности нормальной микрофлоры кишечника. К пробиотикам относятся живые молочнокислые бактерии и бифидобактерии.

Пребиотические – продукты, содержащие в своем составе пребиотики – вещества, обеспечивающие при систематическом употреблении в пищу человеком в составе пищевых продуктов благоприятное воздействие на организм человека в результате избирательной стимуляции роста и (или) повышения биологической активности нормальной микрофлоры кишечника.

Основными видами пребиотиков являются: ди- и трисахариды; олиго- и полисахариды; многоатомные спирты; аминокислоты и пептиды; ферменты; органические низкомолекулярные и ненасыщенные высшие жирные кислоты; антиоксиданты; полезные для человека растительные экстракты и др. Так, вследствие действия фермента β-галактозидазы, продуцируемого термофильным стрептококком, на молочный сахар образуются важные бифидогенные продукты, повышающие активность бифидобактерий и стимулирующие их развитие.

Наиболее выраженный эффект можно получить рациональной комбинацией пробиотиков и пребиотиков. Такие продукты называются *синбиотики*. В них пробиотики и пребиотики оказывают взаимно усиливающее воздействие на физиологические функции и процессы обмена веществ в организме человека.

Учитывая это, разработаны технологические процессы производства кисломолочных продуктов с бифидобактериями, такие, как биойогурты, биокефир, биоряженка, биосметана и др., которые выпускаются на молочных заводах страны. Примером другого направления является создание специализированных биологически активных добавок (БАД) с использованием молочнокислых бактерий и продуктов их жизнедеятельности.

Контрольные вопросы

1. Какие микроорганизмы вызывают молочнокислое брожение? Дайте им характеристику.
2. Чем полезны кисломолочные продукты питания?
3. Что такое пробиотики, пребиотики и синбиотики?

Лабораторная работа № 8

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЧЕСТВА КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ МИКРОСКОПИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Цель занятия: дать оценку исследуемым кисломолочным продуктам по микроскопической картине.

План проведения занятия

Приготовить окрашенные препараты кисломолочных продуктов и дать им оценку.

Задание 1. Изучить требования нормативных документов к микробиологическим показателям исследуемых образцов кисломолочных продуктов.

Изучите требования, предъявляемые действующими нормативными документами к микробиологическим показателям качества исследуемых кисломолочных продуктов питания.

Задание 2. Приготовить из исследуемых кисломолочных продуктов препараты, промикроскопировать их и заполнить табл. 8.

Таблица 8

Характеристика качества кисломолочных продуктов

Наименование продукта	Микроорганизмы, которые должны входить в закваску	Микроорганизмы в поле зрения		
		рисунок	заквасочные	посторонние

Качество кисломолочных продуктов устанавливается чаще микроскопическим методом исследования.

Каждый кисломолочный продукт имеет микрофлору определенного состава, которая обусловлена микроорганизмами закваски.

Микроскопический метод позволяет установить, нормальна ли микрофлора данного продукта, выявить присутствие посторонней микрофлоры и количественное соотношение ее, а также микрофлоры закваски. Это дает возможность судить о качестве продукта.

Наличие, например в твороге, сметане, палочковидных бактерий и дрожжей, клеток и гиф *Geotrichum candidum* (молочная плесень) свидетельствует о снижении качества этих продуктов. Нормальная микрофлора

их состоит в основном из стрептококков. Для ацидофильных продуктов характерно наличие ацидофильной палочки (тонких, относительно длинных бесспорных палочковидных клеток); дрожжей и гиф плесеней не должно быть. В йогурте преобладают стрептококки при наличии 5–15 палочек в поле зрения микроскопа. Кефир – продукт смешанного брожения: молочнокислого и спиртового. В нем обильно размножаются стрептококки. В небольшом количестве могут встречаться палочковидные бесспорные бактерии и единичные дрожжевые клетки.

1. Препарат для микроскопирования приготовить следующим образом. Бактериологической петлей взять немного продукта и перенести на чистое предметное стекло. Если мазок очень густой, смешать с каплей воды и тщательно размазать на стекле тонким слоем. Высушить мазок и зафиксировать.

Фиксированный мазок окрасьте по методу Грама и промикроскопируйте с иммерсионным объектом.

2. Просмотрите препарат не менее чем в 10 полях зрения и установите по морфологическим признакам, какие микроорганизмы присутствуют в продукте; зарисуйте их. Полученные результаты занесите в табл. 8.

3. Дайте заключение о соответствии обнаруженной микрофлоры нормальной микрофлоре данного продукта. Качество продукта оцените словами «отличное», «хорошее», «удовлетворительное» и «неудовлетворительное».

Контрольные вопросы

1. Какие микробиологические требования предъявляются к кисломолочным напиткам?

2. Как оценить качества кисломолочных продуктов с помощью микроскопического метода исследования?

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Мудрецова-Висс, К.А. Микробиология, санитария и гигиена: учебник / К.А. Мудрецова-Висс, В.П. Дедюхина. – 4-е изд., испр. и доп. – М.: ИД «Форум»; Инфра-М, 2013. – 400 с.: ил.

Мудрецова-Висс, К.А. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии: учеб. пособие / К.А. Мудрецова-Висс, В.П. Дедюхина. – Владивосток: Изд-во ДВГАЭУ, 2002. – 216 с.

Жарикова, Г.Г. Микробиология, санитария и гигиена пищевых продуктов: практикум / Г.Г. Жарикова, А.О. Козьмина. – М.: Изд-во ГЕЛАН, 2001. – 256 с.

Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции», принят решением Совета Евразийской экономической комиссии от 9 октября 2013 г. № 67

Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции», утвержден решением Комиссии Таможенного союза от 9 декабря 2011 г. № 880.

Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 024/2011 «Технический регламент на масложировую продукцию», утвержден Решением Комиссии Таможенного союза от 9 декабря 2011 г. № 883.

Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 005/2011 «О безопасности упаковки», утвержден решением Комиссии Таможенного союза от 16 августа 2011 г. № 769.

Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 023/2011 «Технический регламент на соковую продукцию из фруктов и овощей», утвержден решением Комиссии Таможенного союза от 9 декабря 2011 г. № 882.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
Лабораторная работа № 1. Микроскоп и техника микроскопирования ...	4
Лабораторная работа № 2. Изучение морфологии бактерий	10
Лабораторная работа № 3. Изучение морфологии дрожжей	16
Лабораторная работа № 4. Изучение морфологии мицелиальных грибов	20
Лабораторная работа № 5. Микробиологический контроль качества пищевых продуктов	28
Лабораторная работа № 6. Определение степени свежести мяса и рыбы бактериоскопическим методом	38
Лабораторная работа № 7. Молочнокислое брожение и его практическое значение	41
Лабораторная работа № 8. Определение качества кисломолочных продуктов микроскопическим методом	51
СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	53

Учебное издание

Масленникова Евгения Владимировна

ОСНОВЫ МИКРОБИОЛОГИИ

Учебно-практическое пособие

Редактор С.Г. Масленникова
Компьютерная верстка М.А. Портновой

Подписано в печать 05.12.13. Формат 60×84/16.
Бумага писчая. Печать офсетная. Усл. печ. л. 3,25
Уч.-изд. л. 4,4. Тираж 100 экз. Заказ

Издательство Владивостокского государственного университета
экономики и сервиса

690014, Владивосток, ул. Гоголя, 41

Отпечатано во множительном участке ВГУЭС

690014, Владивосток, ул. Гоголя, 41