

Документ подписан простой электронной подписью
Информация о владельце:
ФИО: Локтионова Оксана Геннадьевна
Должность: проректор по учебной работе
Дата подписания: 21.09.2023 15:46:39
Уникальный программный ключ:
0b817ca911e6668abb13a5d426d39e5f1c11eabbf73e943df4a4851fda56d089

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

Кафедра товароведения, технологии и экспертизы товаров

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по учебной работе
О.Г. Локтионова
« 15 » 09 (ЮЗГУ) 2022г.



**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ В ПРОИЗВОДСТВЕ
ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ**

Методические указания по выполнению лабораторных работ для
студентов направления 19.04.02 «Продукты питания из растительного
сырья»

Курск 2022

УДК 664 (075,8)
Составители: М.А. Заикина

Рецензент

Кандидат химических наук, доцент А.Е. Ковалева

Микробиологический контроль в производстве продуктов питания: методические указания по выполнению лабораторных работ / Юго-Зап. Гос. ун-т; сост.: М.А. Заикина. Курск, 2022. - 24 с. Библиогр.: с. 24.

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

Методические указания предназначены для студентов направления подготовки 19.04.02 «Продукты питания из растительного сырья»

Текст печатается в авторской редакции

Подписано в печать. ^{11.01.22} Формат 60x84 1/16.
Усл.печ. л. 1,39 Уч.-изд.л. 1,26. Тираж . Заказ ⁰⁵ Бесплатно.
Юго-Западный государственный университет.
305040, г. Курск, ул. 50 лет Октября, 94

Введение

Правила

Лабораторная работа 1. Оценка жизнеспособности бактериальной загрязненности хлебопекарных дрожжей	5
Лабораторная работа 2. Изучение морфологических культуральных признаков дрожжей	8
Лабораторная работа 3. Определение микотоксинов в зернопродуктах иммуноферментным анализом (ИФА)	11
Лабораторная работа 4. Исследование муки на возбудителя «картофельной болезни» хлеба	14
Лабораторная работа 5. Бактериологический анализ качества хлебобулочных изделий	16
Лабораторная работа 6. Микрофлора сахара и способы ее определения	19
Лабораторная работа 7. Микрофлора солода и способы ее определения	22
Список рекомендательной литературы	24

ВВЕДЕНИЕ

Методические указания к выполнению лабораторных работ предназначены для студентов направления подготовки 19.04.02

«Продукты питания из растительного сырья» с целью оказания помощи студентам и дополнения знаний полученных при самостоятельном изучении литературных источников, приобретении умений и навыков в самостоятельной научно-исследовательской работе.

Методические указания разработаны в соответствии с требованиями Федерального государственного образовательного стандарта. Перечень лабораторных работ, их объем соответствуют учебным планам и рабочим программам дисциплин.

При подготовке к занятиям студенты должны изучить соответствующий теоретический материал по учебной литературе, выполнить задания для самостоятельной работы, ознакомиться с содержанием и порядком выполнения лабораторной работы.

Каждое занятие содержит цель его выполнения, материальное обеспечение, теоретические сведения, вопросы для подготовки, в отдельных случаях объекты исследования, задания для выполнения работы в аудитории и дома.

При выполнении лабораторных работ основным методом обучения является самостоятельная работа студентов под руководством преподавателя. Индивидуализация обучения достигается за счет распределения между студентами тем разделов дисциплины для самостоятельной проработки и освещения их на лабораторных занятиях. Разнообразие заданий достигается за счет многовариантных комплектов стандартов, образцов и других средств обучения.

Результаты выполненных каждым студентом заданий обсуждаются в конце занятий. Оценка преподавателем лабораторной работы студента осуществляется комплексно: по результатам выполненного задания, устному сообщению и качеству оформления работы, что может быть учтено в рейтинговой оценке знаний студента.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РАБОТ

1. Отчеты по каждой теме работы оформляются в тетради для лабораторных работ.

2. Перед оформлением каждой работы студент должен четко написать ее название, цель выполнения, объекты и результаты исследования, теоретические сведения. Если предусмотрено оформление работ в виде таблиц, то необходимо все результаты занести в таблицу в тетради. После каждого задания должно быть сделано заключение с обобщением, систематизацией или обоснованием результатов исследований.

3. Каждую выполненную работу студент защищает в течение учебного семестра.

Выполнение и успешная защита лабораторных работ являются допуском к сдаче теоретического курса на зачете.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1

ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ И БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЗАГРЯЗНЁННОСТИ ХЛЕБОПЕКАРНЫХ ДРОЖЖЕЙ

Цель работы: выработать навыки оценки качества хлебопекарных дрожжей по микробиологическим показателям.

Материально-техническое обеспечение: сухие дрожжи, питательные среды для микроорганизмов и физиологический раствор, стеклянная посуда, электронные весы, дозаторы объёмом 0,1-1 мл, световой микроскоп, настольная лам-па, спиртовая горелка, термостат, бактериологические петли, стеклянный шпатель, стеклянные поплавки, предметные и покровные стёкла, набор оборудования для окраски микробных препаратов, сахар, KH_2PO_4 , спиртоводный раствор метиленового голубого, 96%-й раствор этилового спирта для обработки шпателя, иммерсионное масло, толуол и салфетки для протирания объективов, маркер, шпагат, обёрточная бумага.

Краткие теоретические сведения

В производстве хлебобулочных изделий из пшеничной муки применяют в основном хлебопекарные дрожжи. Они представляют собой биомассу одноклеточных микроскопических грибов (дрожжей) вида *Saccharomyces cerevisiae*, обладающих богатым комплексом биологически активных веществ и ферментативной активностью, что

обеспечивает сбраживание углеводов муки и разрыхление теста.

В производстве теста используют прессованные, сушеные хлебопекарные дрожжи и дрожжевое молоко (полуфабрикат дрожжевого производства, отпускается близлежащим хлебозаводам взамен прессованных дрожжей; представляет собой небродящую водяную суспензию с концентрацией дрожжей 600 - 700 г / л).

Прессованные дрожжи - это брикеты светло - серого или светло - желтоватого цвета с содержанием влаги около 75%. В 1 г прессованных дрожжей содержится от 8 до 12 млрд. клеток.

Сушеные дрожжи имеют форму вермишели или обкатанных гранул светло- желтого или светло - коричневого цвета влажностью 7.5 - 8.0%. Получают их из прессованных дрожжей после сушки формованных частиц. Перед использованием их размачивают в воде и активируют, то есть переводят клетки в жизнеспособное состояние. Расход сушеных дрожжей для приготовления теста в 2 раза больше, чем прессованных.

Дрожжи независимо от их товарной формы (прессованные, сушеные и жидкие) при приготовлении теста выступают возбудителем спиртового брожения, одним из продуктов которого являются пузырьки диоксида углерода. Они обуславливают создание в хлебе пористой структуры.

Контроль качества прессованных дрожжей производят:

- по органолептическим показателям - цвет, консистенция, запах, вкус;
- по физико-химическим - влажность, подъемная сила, осмоустойчивость, кислотность, стойкость, содержание общего азота, фосфора, ферментативная активность;
- по микробиологическому анализу.

Контроль качества сушеных хлебопекарных дрожжей производят по физико-химическим и микробиологическим показателям: влажность, подъемная сила, количество отмерших клеток, стойкость сушеных дрожжей при хранении.

Проведение анализа

1. Разделиться на две рабочие группы. Каждой группе выбрать вид дрожжей для изучения. В тетради указать название и производителя по всем видам дрожжей.

2. Приготовить взвесь дрожжевых клеток. Влажной стерильной бактериологической петлёй взять сухие дрожжи из пакета и смыть в пробирку со стерильным физиологическим раствором. Тщательно перемешать жидкость энергичным перекачиванием пробирки между ладонями до получения равномерной непрозрачной дрожжевой взвеси.

3. Провести микроскопию дрожжей в препарате «раздавленная капля». На предметное стекло нанести 3-4 петли дрожжевой взвеси, затем накрыть её покровным стеклом, т.е. приготовить препарат «раздавленная капля». На край покровного стекла нанести каплю спиртоводного раствора метиленового голубого, которая начинает проникать под стекло (подслаиваться). Когда окрасится половина препарата излишки краски сверху удалить фильтровальной бумагой и немедленно микроскопировать препарат под масляной иммерсионной системой. В тетради необходимо указать соотношение живых и мёртвых клеток (мёртвые – тёмно-синего цвета, живые – не окрашены) и наличие в препарате бактериальной микрофлоры, которая вредит процессу спиртового брожения (молочнокислые бактерии и бациллы – длинные палочки, уксуснокислые бактерии – короткие палочки, кокки – шаровидные формы). Результаты исследований обеих рабочих групп внести в тетрадь.

4. Сделать посев дрожжевой взвеси на плотную питательную среду Сабуро по методу Дригальского. Подписать 3 чашки Петри со средой Сабуро. В 1-ю чашку Петри перенести 0,1 мл взвеси из пробирки и растереть по поверхности среды стеклянным шпателем, который предварительно стерилизовать в горящем 96%-м растворе этилового спирта. Затем оставшиеся на шпателе дрожжи последовательно распределить по 2-й и 3-й чашкам Петри со средой Сабуро. Чашки Петри с посевами поставить в термостат при 37 °С на 2-3 суток.

5. Совместно обеим группам приготовить питательные среды для определения сахаролитической активности дрожжей. В колбе на 500 мл приготовить среду следующего состава: пептон – 0,6 г, KN_2PO_4 – 0,75 г, дистиллированная вода – 300 мл. 200 мл полученной среды разлить в 4 колбы по 50 мл и внести по 1 г различных сахаров: в 1-ю колбу – глюкозу, во 2-ю – сахарозу, в 3-ю –

мальтозу, в 4-ю – лактозу. Оставшаяся в большой колбе среда служит контролем, поэтому в неё сахар не вносить. Содержимое колб тщательно перемешать. Из каждой колбы разлить по 3 пробирки со средой, заполняя их на 2/3 объема. В каждую пробирку поместить стеклянный поплавок. Поплавок должен полностью быть заполнен средой и располагаться запаянным концом вверх. Пробирки закрыть ватно-марлевыми пробками, подписать, поставить в штатив, закрыть бумажным колпачком, который крепится шпагатом, и поставить на стерилизацию. Стерилизация будет проводиться в автоклаве при 1,5 атмосферах в течение 30 минут.

Задания

Задание 1. Зафиксировать результаты исследования оценки жизнеспособности и бактериальной загрязненности хлебопекарных дрожжей.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2 ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ПРИЗНАКОВ ДРОЖЖЕЙ

Цель работы: изучить морфологические и культурные признаки дрожжей.

Материально-техническое обеспечение: посеvy дрожжей от прошлого занятия, жидкие питательные среды для дрожжей с сахарами и KH_2PO_4 от прошлого занятия, физиологический раствор, стеклянная посуда, дозаторы объёмом 0,1-1 мл, световой микроскоп, настольные лампы, спиртовая горелка, термостат, бактериологические петли, предметные стёкла, набор оборудования для окраски микробных препаратов, спиртовый раствор метиленового голубого, иммерсионное масло, толуол и салфетки для протирания объективов, маркер.

Краткие теоретические сведения

Культуральные признаки. Дрожжи выращивают на стерильном солодовом, виноградном, меласном сусле концентрацией 8-10 % СВ

или сусло-агаре в течение 2-3 суток при 25-28° С. При росте на жидких средах дрожжи вызывают помутнение, осадок, образование кольца или плёнки. На агаризованных средах колонии дрожжей блестящие, кремообразные, реже плёнчатые и белёсые и лишь немногие блестящие розово-красные.

Морфологические признаки. Дрожжи – это одноклеточные грибы, не образующие истинного мицелия. Форма их клеток разнообразна. Размножаются дрожжи вегетативным и половым путем. Вегетативные способы – это почкование и деление. В неблагоприятных условиях дрожжи образуют споры по аскомицетному или базидиомицетному типу, соответственно относятся к классам аскомицетов и базидиомицетов.

Для изучения морфологии отдельных представителей дрожжей готовят препараты «раздавленная капля»; бактериологической петлей берут чистую культуру и равномерно распределяют клетки в капле воды на предметном стекле. Сверху помещают покровное стекло, избыток жидкости удаляют фильтровальной бумагой. Микрокопирование ведут с объективом 40^x.

Форма (рис. 1) вегетативных клеток дрожжей разнообразна: округлая, овальная, яйцевидная (*Saccharomyces*), цилиндрическая (*Schizosaccharomyces*), лимоновидная (*Saccharomycodes*). Некоторые дрожжи имеют форму, отличающую их от других видов: стреловидную (*Brettanomyces*), треугольную (*Trigonopsis*), серповидную (*Selenotila*), колбовидную (*Schizoblastosporion*).



Рисунок 1- Дрожжи: 1– *Saccharomyces*; 2 – *Schizosaccharomyces*; 3 - *Saccharomycodes*; 4 – *Candida*.

Дрожжевая клетка – эллипсоид вращения. Малый диаметр колеблется от 3 до 5 мкм, большой – 6 до 10 мкм. Форма и размеры дрожжевых клеток зависят от вида, возраста, питательной среды, способа культивирования.

Ход выполнения работы

1. Разделиться на рабочие группы, сформированные на прошлом занятии. Описать в тетради культуральные признаки выросших на чашках Петри хлебопекарных дрожжей из рода *Saccharomyces*. Различия в строении колоний говорит о присутствии посторонних дрожжей из родов *Candida* или *Torulopsis*. В данном случае необходимо провести их описание отдельно и указать процентное соотношение к общему количеству колоний на чашке. Например: культура № 1 – 70%, культура №2 – 30%. На среде может также наблюдаться рост плесени, рост которой необходимо зарегистрировать без подсчёта колоний.

2. Сделать взвесь культуры дрожжей в физиологическом растворе. Для этого бактериологической петлёй взять 3-4 раза культуру дрожжей с чашки Петри и растереть её по стенке пробирки на границе воздуха и жидкости, а затем смыть дрожжи со стенки физиологическим раствором. Мутность всех взвесей должна быть одинаковой.

3. Провести микроскопию дрожжевой взвеси с окраской фиксированного мазка метиленовым голубым и охарактеризовать микробные клетки морфологически (форму, величину). Наличие вытянутых, круглых, лимonoобразных и мелких дрожжевых клеток говорит о присутствии посторонних дрожжей из родов *Candida* или *Torulopsis*. При наличии в препарате посторонней дрожжевой или бактериальной микрофлоры её необходимо описать отдельно и указать процентное соотношение к общему количеству дрожжевых клеток. Занести в тетрадь результаты изучения культуральных и морфологических признаков дрожжей, полученные другой рабочей группой.

4. Сделать в тетради заключение о соответствии дрожжей следующим нормативным требованиям: количество мёртвых клеток не более 5%, количество посторонних дрожжевых грибов не более 30%, количество кислотообразующих бактерий не более 20%. Наличие в препарате значительного количества посторонней дрожжевой и бактериальной микрофлоры тормозит процессы спиртового брожения и подъёма теста.

5. Провести высеv по 0,5 мл дрожжевой взвеси в пробирки на жидкие питательные среды с различными сахарами: с глюкозой

(среда 1), с сахарозой (среда 2), с мальтозой (среда 3), с лактозой (среда 4), без сахара (среда 5). Высев проводить с соблюдением требований стерильности. Посевы подписать и поставить в термостат при 25 °С на 5-7 суток.

Задания.

Задание 1. Зафиксировать результаты изучения морфологических и культуральных признаков хлебопекарных дрожжей.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКОТОКСИНОВ В ЗЕРНОПРОДУКТАХ ИММУНОФЕРМЕНТНЫМ АНАЛИЗОМ (ИФА)

Цель работы: обнаружение микотоксинов в смывах с зернопродуктов, изучение метода определения токсинов иммуноферментным анализом

Материально-техническое обеспечение: 96-луночный полистироловый планшет для ИФА, исследуемый антиген, фосфатно-солевой буферный раствор с рН=7,2-7,4, фосфатно-солевой буферный раствор с твином-80, одноканальные дозаторы объемом 10-100 мкл, 100-1000 мкл и 1-5 мл, восьмиканальный дозатор объемом 50-300 мкл, бычий сывороточный альбумин, весы электронные, штатив с пробирками, фильтровальная бумага, холодильник, диагностическая сыворотка, лимонная кислота, Na_2HPO_4 , гидроперит, ортофенилдиамина, соляная кислота, одноканальные дозаторы объемом 10-100 мкл, 100-1000 мкл и 1-5 мл, восьмиканальный дозатор объемом 50-300 мкл.

Краткие теоретические сведения

В ряд лунок пластиковой микроплашки вносят по 0,1 мл последовательных двух кратных разведений исследуемого материала (антигена) в титрах с 1:2 до 1:4096, инкубируют 20 минут при 37 °С. Антиген адсорбируется на поверхности лунок.

Затем лунки промывают фосфатно-солевым буферным

раствором с твином 20 (ФСБ-Т), чтобы удалить избыток несорбированного на них антигена.

Не занятые антигеном участки поверхности лунки обрабатывают внесением в неё 0,2 мл 2%-го раствора бычьего сывороточного альбумина (2% БСА) на 20 минут при 37 °С, затем промывают ФСБ-Т, чтобы удалить несорбированное вещество.

ИФА ставят с использованием следующих "отрицательных" контролей:

1. Антиген в титре 1:2 + Антикроличы Ig (без специфичной сыворотки);
2. Антиген в титре 1:4096 + Антикроличы Ig (без специфичной сыворотки);
3. Специфичная сыворотка в рабочем титре + Антикроличы Ig (без антигена);
4. Антикроличы Ig (без антигена и специфичной сыворотки).

Фосфатно-солевой буферный раствор с рН=7,2-7,4 (ФСБ) Для приготовления 0,1 М ФСБ рН=7,2-7,4 смешивают 810 мл раствора А (14,2 г Na_2HPO_4 , растворенные в 1 литре дистиллированной воды) и 190 мл раствора Б (7,8 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, растворенные в 0,5 литрах дистиллированной воды). Проверяют рН и, если необходимо, доводят до 7,2-7,4 добавлением раствора А, если рН надо сдвинуть в щелочную сторону или раствора Б, если рН надо сдвинуть в кислую сторону. Раствор хранят при 4°C в течение 6 месяцев.

Непосредственно перед использованием готовят 0,01 М ФСБ рН=7,2-7,4: к 100 мл 0,1 М ФСБ рН=7,2-7,4 добавляют 900 мл дистиллированной воды и 8,5 г хлорида натрия.

ФСБ с твином-20 (ФСБ-Т) К 1 литру ФСБ рН=7,2-7,4 добавляют 0,5 мл твина-20. 2%-й раствор бычьего сывороточного альбумина (2% БСА) 0,9 г БСА растворяют в 45 мл 0,01 М ФСБ рН=7,2-7,4. Раствор хранению не подлежит.

Принцип метода. На стенках лунок адсорбируются исследуемый антиген и блокирующее вещество. Избытки веществ удаляются промыванием.

Ход анализа.

1. Студенты готовят двух кратные последовательные

разведения исследуемого антигена на ФСБ рН=7,2-7,4, начиная с разведения 1:2, проводят адсорбцию на стенках лунок планшет антигена и промывают лунки планшета.

2. Студенты проводят адсорбцию на стенках лунок планшета 2% БСА и промывают планшет.

3. При отсутствии возможности непрерывного проведения анализа в течение 3 часов промытый планшет закрывают и помещают в холодильник.

ВНЕСЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКИ, АНТИВИДОВОГО ПЕРОКСИДАЗНОГО КОНЬЮГАТА, СУБСТРАТА И УЧЁТ РЕАКЦИИ

В ряд обработанных антигеном лунок вносят по 0,1 мл диагностической сыворотки в рабочем титре, инкубируют 20 минут при 37 °С, затем промывают ФСБ-Т, чтобы удалить несорбированные антитела.

В лунки вносят по 0,1 мл меченой ферментом антивидовой сыворотки, инкубируют 20 минут при 37 °С, затем отмывают ФСБ-Т от не связавшихся антител.

В лунки вносят 0,1 мл раствора субстрата, инкубируют 5 минут при 20 °С, прерывают реакцию концентрированной соляной кислотой (стоп-раствор) и учитывают результат реакции по появлению окраски содержимого лунок.

Цитратно-фосфатный буферный раствор с рН=5,0-5,2 (ЦФБ)

В 25 мл дистиллированной воды растворяют 0,96 г лимонной кислоты и 1,78 г Na_2HPO_4 .

Субстратная смесь для ИФА 0,01 г ортофенилдиамина растворяют в 25 мл ЦФБ рН=5,0-5,2 и добавляют к раствору 0,5 мл 3%-й перекиси водорода. Смесь готовят за 10-15 минут до использования.

Сток-раствор для ИФА. Готовят 2 н раствор соляной кислоты. Для этого к 25 мл дистиллированной воды добавляют 4,5 мл HCl с содержанием действующего вещества 38%.

Принцип метода. Происходит взаимодействие специфических антител с антигеном, а антивидовых иммуноглобулинов со специфическими антителами. Избытки веществ удаляются промыванием. Субстрат разрушается с изменением его окраски в жёлтый цвет.

Ход анализа.

1. Студенты проводят в лунках планшет от прошлого занятия инкубацию диагностической сыворотки. По завершению инкубации осуществляется промывка лунок.

2. Студенты проводят в лунках инкубацию конъюгата. По завершению инкубации осуществляется промывка лунок.

3. Студенты вносят в лунки субстрат, а затем добавляют стоп-раствор.

4. Цветную реакцию учитывают на иммуноферментном анализаторе.

5. Студенты анализируют полученные данные и записывают результаты анализа в тетради.

Задания

Задание 1. Записать результаты проведенных лабораторных исследований и соответствующие расчеты по обнаружению микотоксинов в смывах с зернопродуктов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №4 ИССЛЕДОВАНИЕ МУКИ НА ВОЗБУДИТЕЛЯ «КАРТОФЕЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ» ХЛЕБА

Цель работы: сформировать навык определения степени загрязнённости муки возбудителем «картофельной болезни» хлеба.

Материально-техническое оснащение: мука, мясопептонный бульон и физиологический раствор, стеклянная и керамическая посуда, весы, термостат, маркер, металлический шпатель, штативы для пробирок, кусочки стерильного хлеба в чашках Петри, микроскоп, предметные стёкла, анилиновые красители, спиртовая горелка.

Краткие теоретические сведения

СанПиН микробиологические показатели предусмотрены только для пшеничной муки. В ней определяется наличие возбудителя «картофельной болезни» хлеба. Возбудителем данного вида порчи хлеба является «картофельная палочка» – *Bacillus*

mesentericus. Это крупная, неподвижная, грамположительная палочка, образующая споры. Споры термоустойчивы и сохраняются при выпечке хлеба, т.к. температура хлебного мякиша на данной стадии производства не превышает 95 °С. «Картофельная болезнь» хлеба характеризуется появлением в мякише слизистых коричневых очагов со сладковато-хмелевым запахом. Возникает при хранении хлеба в температурных условиях выше 20 °С. Обсеменённость хлеба «картофельной палочкой» зависит от количества спор в муке. В муке высшего сорта, которую получают из центральной части зёрен, спор обычно мало. В муку споры попадают из почвы.

Принцип метода. Навеску муки высевают на жидкие питательные среды.

Ход анализа

1. Распределиться на две группы. Каждой группе выбрать для исследования один вид муки. В тетради указать название, производителя, срок годности данного продукта.

2. На электрических весах стерильно отмерить 1 г муки и растереть в керамической ступке с 9 мл стерильного физиологического раствора (разведение муки 1:10).

3. Затем приготовить два последовательных десятикратных разведения полученной взвеси муки в пробирках с 9 мл физиологического раствора (разведения муки 1:100 и 1:1000).

4. Из ступки и пробирок перенести по 1 мл содержимого в пробирки с МПБ.

5. Подписать пробирки с посевами и инкубировать при 37 °С 1-2 суток.

6. Учесть наличие микробного роста на МПБ от прошлого занятия с описанием в тетради культуральных признаков. Наблюдать появление характерного для «картофельной палочки» роста: бульон прозрачный, на его поверхности морщинистая плёнка, на дне небольшой осадок. В случае наличия культуральных признаков, характерных для «картофельной палочки», провести микроскопию с окраской мазков по методу Грама. «Картофельная палочка» крупная, грамположительная. Зафиксировать результаты микроскопии в тетрадях.

7. По итогам изучения культуральных и морфологических

признаков выросших микробов сделать оценку степени обсеменённости муки возбудителем «картофельной болезни» хлеба, руководствуясь следующими положениями:

- слабое обсеменение – рост «картофельной палочки» наблюдается из разведения муки 1:10.

среднее обсеменение – из разведений 1:10 и 1:100.

- сильное обсеменение – из разведений 1:10, 1:100 и 1:1000.

8. Для подтверждения способности данного микроба вызывать признаки «картофельной болезни» в хлебе провести посев 5 мл содержимого пробирки на кусочек стерильного хлеба в чашке Петри.

9. Посевы подписать и термостатировать при 37 °С 3-5 суток во влажной камере.

10. Учесть наличие микробного роста на чашках Петри с кусочками хлеба от прошлого занятия с характерными для "картофельной болезни" хлеба признаками: слизистые коричневые очаги со сладковато-хмелевым запахом в мякише. Результаты осмотра внести в тетради. В случае наличия на хлебе очагов, характерных для «картофельной палочки», провести микроскопию с окраской мазков по методу Грама.

Задания

Задание 1. Зафиксировать результаты микроскопии в тетрадях. Сделать окончательное заключение о степени обсеменённости муки возбудителем "картофельной болезни хлеба".

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5 БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КАЧЕСТВА ХЛЕБОБУЛОЧНЫХ ИЗДЕЛИЙ

Цель работы: сформировать навык определения качества хлебобулочных изделий по микробиологическим показателям.

Материально-техническое обеспечение: образцы хлебобулочных изделий, питательные среды для микроорганизмов и физиологический раствор, стеклянная и керамическая посуда, весы, термостат, водяная баня, спиртовая горелка, ножницы, пинцеты, нож., стерильный песок, спирт, вата, маркер, штатив для пробирок.

Краткие теоретические сведения

Хлебобулочные изделия выпускаются с различными начинками. Неравномерный прогрев центральной части хлебобулочного изделия не может гарантировать полной гибели попавшей сюда микрофлоры. После тепловой обработки жизнеспособными остаются бактериальные споры и незначительное число вегетативных форм микроорганизмов. Они вызывают порчу продукта. Кроме гнилостных бактерий сюда могут попадать возбудители пищевых токсикоинфекций и пищевых бактериальных токсикозов. СанПиН для хлебобулочных изделий предусматривает определение групп микроорганизмов отражённых в таблице.

Таблица - Требования СанПиН для хлебобулочных изделий

Продукты	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г, см ³), в которой не допускаются				Плесени, КОЕ/г, не более
		БГКП	S. aureus	Протей	Сальмонеллы	
Хлебобулочные изделия, в т.ч. с фруктовыми и овощными начинками	1×10^3	1,0	1,0	-	25	50
Хлебобулочные изделия с творогом и сыром	1×10^3	1,0	1,0	0,1	25	50
Хлебобулочные изделия с заварным кремом	5×10^3	0,01	1,0	-	25	50
Хлебобулочные изделия с мясо-, рыбо- и морепродуктами	1×10^3	1,0	1,0	0,1	25	50

Принцип метода. Измельчённую навеску хлебобулочного изделия высевают на жидкие и плотные питательные среды.

Ход анализа

1. Распределиться на две группы. Каждой группе выбрать для исследования один вид хлебобулочного изделия. В тетради указать название, производителя, срок годности хлебобулочного изделия.

2. Контролировать процесс плавления плотных питательных сред на водяной бане.

3. Поверхность хлебобулочного изделия в оболочке протереть горящим ватным тампоном, смоченным в спирте, разрезать изделие вдоль стерильным ножом.

4. Точечные пробы отобрать из нескольких участков обеих половинок изделия:

- 20 г для приготовления испытуемой взвеси (определяют КМАФАнМ, БГКП, плесневые грибы);

- 25 г для исследования на сальмонеллёр;

- 1 г для выявления золотистого стафилококка.

5. Приготовить испытуемую взвесь продукта 1:5.

6. Определить КМАФАнМ в 1 г продукта.

Для этого готовят разведения продукта 1:10 и 1:100 и высевают их в МПА на чашках Петри. Чашки Петри с посевами термостатируют при 37 °С 2 суток.

7. Определить присутствие БГКП в 1 г продукта.

С этой целью в пробирку со средой Кесслера и поплавком вносят 5 мл испытуемой взвеси (разведение продукта 1:5), инкубировать при 37 °С 20 часов.

8. Определить присутствие сальмонелл в 25 г продукта. Навеску продукта массой 25 г тщательно измельчают и переносят во флакон со 100 мл магниевой среды и термостатируют при 37 °С сутки.

9. Определить присутствие золотистого стафилококка в 1 г продукта.

Навеску продукта массой 1 г тщательно измельчают и переносят в пробирку с 9 мл солевого бульона. Пробирку с посевом термостатируют при 37 °С сутки.

10. Определить количество плесени в 1 г продукта.

Для этого высевают в агар Сабуро на чашках Петри разведение продукта 1:10. Чашки Петри с посевами термостатируют при 26 °С 5 суток.

11. На чашках Петри с МПА подсчитать количество выросших микробных колоний, результаты подсчётов необходимо умножить на степень разведения продукта.

Полученные результаты по двум видам продуктов внести в тетрадь.

Задание 1. Определение БГКП в 1 г продукта.

Из пробирок со средой Кесслера, в которых наблюдается всплытие поплавков, провести рассев содержимого на 3-4-х секторах чашки Петри со средой Эндо. Посевы инкубировать при 37 °С сутки. Если в среде Кесслера не наблюдаются характерные изменения, то можно сделать заключение о соответствии продукта СанПиН по показателю «БГКП» с внесением соответствующей записи в тетрадь.

Задание 2. Определение сальмонелл в 25 г продукта.

Сделать рассев культуры микроорганизмов с магниевой среды на 3-4-х секторах чашки Петри со средой Эндо. Чашки Петри поставить в термостат при 37 °С на 1-2 суток.

Задание 3. Определение золотистого стафилококка в 1 г продукта. Из пробирки с соевым бульоном рассеять содержимое на 3-4-х секторах чашки Петри с желточно - соевым агаром. Посев термостатировать при 37 °С сутки.

Задание 4. Определить количество плесени в 1 г продукта.

На чашках Петри с агаром Сабуро подсчитать количество выросших колоний плесени. Для плесневых грибов характерны: на поверхности среды – круглые, выпуклые, непрозрачные, цветные колонии с ворсистой поверхностью; в слое среды – колонии с отростками мицелия.

Результаты подсчётов необходимо умножить на степень разведения продукта.

Задание 5. Зафиксировать результаты бактериологического анализа в тетрадях. Сделать окончательное заключение о качестве хлебобулочных изделий.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6

МИКРОФЛОРА САХАРА И СПОСОБЫ ЕЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Цель работы: ознакомиться с методикой проведения микробиологического анализа по исследованию микрофлоры сахара и определить общее количество мезофильных, в т.ч. слизееобразующих бактерий в сахаре-песке.

Материально-техническое оснащение: навеска сахара, дистиллированная вода, штатив с пробирками, стеклянная и керамическая посуда, чашки Петри, термостат, водяная баня, пептон, глюкоза, агар, бромкрезол пурпур (индикатор).

Краткие теоретические сведения

В сахарный песок микроорганизмы попадают при отбелке, сушке, упаковке и хранении.

Наиболее легко инфицируется сахар с повышенной влажностью. При влажности сахара не более 0,15% (стандарт) микроорганизмы сохраняют жизнеспособность, но не развиваются. В тоже время было установлено, что если при влажности 0,15% в 1г. сахара насчитывали в среднем 50 шт. бактерий. То при влажности до 1,3% их количество возрастало до 10 000 в 1г.

В сахаре встречаются мезофильные и термофильные бактерии, аэробные и анаэробные. Среди них имеются газообразующие и кислотообразующие. Среди термофилов преобладают бациллы с чрезвычайно термоустойчивыми спорами. В сахарном песке встречаются также дрожжи и плесневые грибы, главным образом виды родов *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*.

Сахар, избыточно обсемененный микроорганизмами, может быть причиной порчи кондитерских изделий, например вафель, шоколадных начинок, рулетов и др. сахар является одним из основных источников внесения термофильной микрофлоры при изготовлении консервов. Известны несколько видов порчи, обусловленной развитием термофилов, сохранившихся в консервах (зеленом горошке, пюреобразных консервах для детского питания и др.) в виде остаточной микрофлоры после стерилизации.

1. Плоскокислая порча, типичный возбудитель *Bacillus stearothermo-philus*. Эти бактерии при усвоении углеводов образуют не газ, а кислоты - уксусную, муравьиную и др. продукты приобретают кислый вкус.

2. Бомбахная порча. Возбудитель - анаэробный термофил - *Clostridium thermosaccharolyticum*. В результате жизнедеятельности этих клостридий образуется CO₂ и водород, банки вздуваются.

Существуют нормы допустимого количества термофилов в сахаре, используемом в консервной промышленности:

Всего спор термофилов не > 125 в 10г. сахара. Спор возбудителей плоского скисания не > 50 в 10г. сахара

Задания

Задание 1. Определить общее количество мезофильных, в т.ч. слизиобразующих бактерий в 1г. сахара-песка.

Для этого навеску сахара 20г. в 100мл стерильной водопроводной воды встряхивать до полного растворения сахара после чего провести посев по 2 мл в 5 чаше на МПА для учета общего количества микроорганизмов и в 5 чашек на сахарный агар (МПА + 10% сахароза) для учета слизиобразующих видов. Посевы выращивают в термостате при $t = 30^{\circ}$ с течение 48-72 часов.

После чего определяют общее количество мезофильных бактерий на МПА и число слизиобразующих, путем подсчета слизистых каплеподобных колоний на сахарном агаре. Сделать препараты, покрасить, смотреть с иммерсией.

Задание 2. Определить общее количество спор термофильных аэробов и отдельно число спор, возбудителей плоского скисания в 10г. сахара.

Для этой цели приготовить раствор сахара в 100мл стерильной воды колбу с раствором сахара выдержать в кипящей водяной бане в течение 5 мин. охладить раствор. Провести посев по 2 мл в 5 чашек и залить их глюкозо-петонной средой следующего состава: пептон 10 г., глюкоза 5г., агар 15г., бромкрезол пурпур (индикатор) 0,04г, вода 100 мл.

Посевы выращивать в термостате при $t = 55^{\circ} - 60^{\circ}\text{C}$ в течение 48 часов. После чего подсчитать общее количество колоний термофилов на глюкозопептонном агаре с индикатором и число колоний, возбудителей плоского скисания, вокруг которых на фиолетовом или пурпурном фоне среды образуется желтый ореол, вследствие взаимодействия образующейся кислоты с индикатором.

Т.к. на 5 чашек было высеяно 2г сахара, то чтобы получить общее число спор аэробных термофилов в 10г., общее число подсчитанных колоний умножают на 5. Для получения числа спор возбудителей плоско кислой порчи в 10г сахара - число колоний с желтым ореолом также умножают на 5.

Выбрать 2-3 преобладающие колонии, описать их и приготовить препараты для микроскопирования. На основании полученных данных дать оценку качества сахара.

МИКРОФЛОРА СОЛОДА И СПОСОБЫ ЕЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Цель работы: ознакомиться с методикой определения микрофлоры солода и провести микробиологический анализ представленных образцов.

Краткие теоретические сведения

Солод является основным источником нежелательной микрофлоры в бродильном производстве. В период замачивания и проращивания зерна микроорганизмы быстро размножаются на его поверхности. В 1г. солода за короткое время общее число микроорганизмов возрастает в 10-20 раз по сравнению с исходным сырьем. Микрофлора солода представлена бактериями, дрожжами и плесневыми грибами.

Среди бактерий преобладают молочнокислые, как гомоферментативные – *Zctobacillus delbrueckii*, *Zactobacillus plantarum*, так и гетероферментативные – *Zeusonostoc* и др. Попадая в готовый продукт (пиво) молочнокислые бактерии вызывают его помутнение, изменяют запах и цвет, а также способствуют закисанию сусла и пива.

Уксуснокислые бактерии инактивируют амилазу солода, образуют пленки на поверхности пива и вызывают его прокисание. Наиболее нежелательным для пивоварения является присутствие в солоде большого количества сарцин (педиококков). Они образуют муть, осадок и ослизнение сусла и пива, придают ему неприятные запах и вкус. Вредное действие на качество пива могут также оказывать некоторые виды дрожжей, в т.ч. несакхаромицеты *Candida Forulopsis*. *Candida mycoderma* развивается на поверхности сусла и пива в виде белой или сероватой пленки и придает пиву неприятные запах и вкус. *Forulopsis albus* (пивная торула) вызывает помутнение и ухудшение вкуса.

Из плесневых грибов в солоде часто встречаются *Penicillium glaucum*, *Asper gillus niger*, *Oidium lactis* (молочная плесень) и *Rhizopus*. Особо опасными для солода являются грибы *Penicillium* и *Rhizopus*. Они убивают зародыш зерна, при этом солод темнеет, резко снижаются его ферментативные свойства.

Задания

Задание 1. Определить общее количество микроорганизмов в 1г солода путем посева его на МПА, МПА с мелом и сусло агаром. Провести подсчет и качественный анализ выросших колоний, описать их, приготовить препараты – для бактерий фиксированные, окрашенные фуксином, для дрожжей в капле воды с окраской метиленовой синей, для грибов в раздавленной капле. Смотреть с соответствующими объективами (90х, 40х и 8х).

СПИСОК РЕКОМЕНДАТЕЛЬНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Петухова, Е. В. Пищевая микробиология [Электронный ресурс] : учебное пособие / Е. В. Петухова, А. Ю. Крыницкая, З. А. Канарская. - Казань : Издательство КНИТУ, 2014. - 117 с.

2. Градова, Н. Б. Биологическая безопасность биотехнологических производств [Текст] : учебное пособие / Н. Б. Градова, Е. С. Бабусенко, В. И. Панфилов. - М. : ДеЛи принт, 2010. - 136 с.

3. Микробиологическая порча пищевых продуктов [Текст] : пер. с англ. / под ред. К. де В. Блекберна. - СПб. : Профессия, 2008. - 784 с.

4. Перетрухина, А. Т. Микробиология сырья и продуктов водного происхождения [Текст] : учебник / А. Т. Перетрухина, И. В. Перетрухина. - СПб. : ГИОРД, 2005. - 320 с.

5. Жарикова, Г. Г. Микробиология продовольственных товаров. Санитария и гигиена [Текст] : учебник / Г. Г. Жарикова. - М. : Академия, 2005. - 304 с. - (Высшее профессиональное образование).

6. Мудрецова-Висс, К. А. Микробиология, санитария и гигиена [Текст] : учебник для студ. вуз. / К. А. Мудрецова-Висс ; т. А. А. Кудряшова ; т В. П. Дедюхина. - М. : Деловая литература, 2001. - 388

7. ГОСТ Р 50474-93. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий).- М.: Изд-во стандартов, 1993.-9с

8. СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества». Действительно с 1 января 2002 г. - М.: Изд-во стандартов, 2002.

9. СанПиН 2.3.2. 1078-01 «Продовольственное сырье и пищевые продукты. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Утв. главным госуд. сан. врачом РФ 6.11.01. –М.: Изд-во стандартов, 2005.

10. ГОСТ 10444.15-94. Продукты пищевые. Методы определения мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. – М.: Изд-во стандартов, 1994.- 19 с.

11. ГОСТ 26670-91. Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов.- М.: Изд-во стандартов, 1992.- 13 с.