

Документ подписан простой электронной подписью

Информация о владельце:

ФИО: Локтионова Оксана Геннадьевна

Должность: проректор по учебной работе

Дата подписания: 27.01.2018 17:55:11

Уникальный программный ключ:

0b817ca911e6668abb13a5d426d39e5f1c11eabb73e943d14a4851fda36d089

МИНОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИИ

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

Кафедра товароведения, технологии и экспертизы товаров



ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

Методические указания по выполнению лабораторных работ для студентов направления 19.03.03 «Продукты питания животного происхождения»

Курск 2018

УДК: 579.2

Составитель: А.Г. Беляев

Рецензент

Кандидат фармакологических наук, доцент *Л.А. Горбачева*

Общая микробиология и микробиология: методические указания по выполнению лабораторных работ / Юго-Зап. гос. ун-т; сост.: А.Г. Беляев. Курск, 2018. 134 с.: Библиогр.: с.133

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

Предназначены для студентов направления подготовки 19.03.03 «Продукты питания животного происхождения» очной, формы обучения.

Текст печатается в авторской редакции

Подписано в печать 15.02.18. Формат 60x84 1/16.

Усл. печ. л. 7,67 Уч.-изд. л. 6,94 Тираж 50 экз. Заказ. 1610 Бесплатно.

Юго-Западный государственный университет.

305040, г. Курск, ул. 50 лет Октября, 94.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
4 семестр	
Лабораторная работа №1 Правила безопасной работы в лаборатории микробиологии. Устройство микроскопа и правила работы с микроскопом. Виды и техника микроскопирования.	7
Лабораторная работа №2 Методы окраски бактерий. Приготовление и микроскопирование фиксированных окрашенных препаратов. Морфология бактерий.	17
Лабораторная работа №3 Морфология мицелиальных грибов и дрожжей. Приготовление и изучение препаратов из живых микроорганизмов.	21
Лабораторная работа №4 Культивирование микроорганизмов. Типы питательных сред и их приготовление.	28
Лабораторная работа №5 Изучение биохимических свойств микроорганизмов.	38
Лабораторная работа №6 Санитарно-гигиенический контроль на предприятиях отрасли.	42
Лабораторная работа №7 Исследование производственных дрожжей.	50
Лабораторная работа №8 Микробиологическое исследование продуктов питания (занятие 1).	61
Лабораторная работа №9 Микробиологическое исследование продуктов питания (занятие 2).	67
5 семестр	
Лабораторное занятие № 1 Микроскопическое исследование мяса	71
Лабораторное занятие №2 Бактериологическое исследование мяса	73
Лабораторное занятие № 3 Микрофлора мяса при холодильном хранении, посоле сушке.	81
Лабораторное занятие № 4 Микробиологическое исследование колбасных изделий и продуктов из мяса	86
Лабораторное занятие № 5 Микроскопическое исследование молока	94
Лабораторное занятие № 6 Микробиологический анализ молока. Отбор проб и подготовка к исследованию. Определение количества в молоке.	99

Лабораторное занятие № 7 Определение патогенных микроорганизмов в молоке	109
Лабораторное занятие №8 Микробиологическое исследование масла. Микробиологическое исследование сыра.	118
Лабораторное занятие №9 Бактериологический контроль качества заквасок, применяемых при изготовлении молочных продуктов.	128
Список рекомендуемой литературы	133

ВВЕДЕНИЕ

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

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

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

Правила оформления работ

1. Отчеты по каждой теме лабораторного занятия оформляются в отдельной тетради.
2. Перед оформлением каждой работы студент должен четко написать ее название, цель выполнения, краткие ответы на вопросы для подготовки, объекты и результаты исследования. Если предусмотрено оформление работ в

виде таблиц, то необходимо все результаты занести в таблицу в тетради. После каждого задания должно быть сделано заключение с обобщением, систематизацией или обоснованием результатов исследований.

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

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

4 семестр

Лабораторная работа №1

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

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

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

Правила работы в микробиологической лаборатории

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

Устройство микроскопа и правила работы с ним

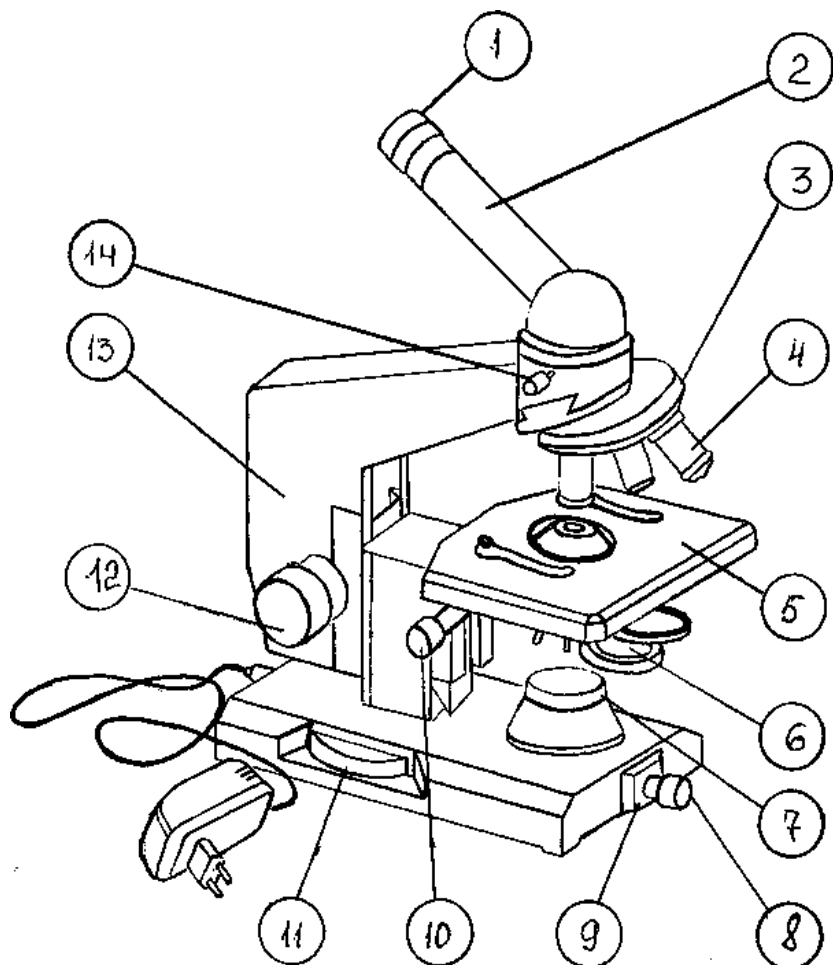
Микроскоп (от греч. micros – малый и scopio – смотрю) – это оптический прибор, состоящий из трех основных частей: механической, оптической и осветительной.

Устройство микроскопа

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

Тубус – зрительная труба микроскопа. В верхнее отверстие тубуса свободно вставляется окуляр, на нижнем конце тубуса находится вращающееся вокруг своей оси револьверное устройство (револьвер), в которое ввинчиваются объективы. Вращая револьвер, можно быстро сменить объективы во время работы с микроскопом, подводя любой объектив под тубус. Объектив должен быть центрирован, т.е. установлен на оптическую ось микроскопа. Для этого револьвер поворачивают вокруг своей оси до появления щелчка.

Предметный столик служит для размещения на нем изучаемого препарата. Препарат закрепляют на столике зажимами (клеммами). В центре предметного столика находится отверстие для прохождения лучей света и освещения препарата. В некоторых конструкциях микроскопа предметный столик может передвигаться с помощью винтов, расположенных по периферии предметного столика. Это дает возможность рассмотреть препарат в различных полях зрения.



- 1 – окуляр
- 2 – монокулярная насадка (тубус)
- 3 – револьверное устройство
- 4 – объектив
- 5 – предметный столик
- 6 – конденсор
- 7 – корпус коллекторной линзы
- 8 – патрон с лампой
- 9 – шарнир
- 10 – рукоятка перемещения кронштейна конденсора
- 11 – рукоятка тонкой фокусировки (микрометрический винт)
- 12 – рукоятка грубой фокусировки (макрометрический винт)
- 13 – тубусодержатель
- 14 – винт для крепления насадки

Рис. 1 Схема устройства светового биологического микроскопа

Рукоятки грубой и тонкой фокусировки (макро- и микровинты) служат для перемещения тубуса вверх и вниз, что позволяет установить его на необходимом расстоянии от препарата. При вращении винтов по часовой стрелке тубус опускается, а при вращении против часовой стрелки – поднимается. При вращении макрометрического винта объектив ориентировочно устанавливается на фокус, т.е. на то расстояние от препарата, при котором он делается видимым. Оборот макровинта позволяет переместить тубус на 20 мм. Микрометрический винт служит для точной установки на фокус. Полный оборот его перемещает тубус на 0,1 мм. С микровинтом следует обра-

щаться очень осторожно: допустимо вращение микровинта не более чем на 180°C в ту или иную сторону.

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

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

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

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

Объективы подразделяются на *сухие* и *иммерсионные*.

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

При работе с *иммерсионными объективами* (x90 или x100) для устранения светорассеяния расстояние между фронтальной линзой объектива и препаратом заполняют иммерсионным (кедровым) маслом, показатель преломления лучей света, которого близок к показателю преломления лучей света, проходящего через стекло.

Общее увеличение микроскопа определяется как произведение увеличения объектива на увеличение окуляра. Например, если в работе используют

окуляр $\times 15$, а под тубусом находится объектив $\times 90$, то увеличение рассматриваемого с помощью микроскопа объекта составит $\times 1350$.

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

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

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

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

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

Правила работы с микроскопом

1. На рабочем столе микроскоп ставят тубусодержателем к себе на расстоянии 3...5 см от края стола;
2. Включают микроскоп в сеть и устанавливают правильное освещение;
3. На предметный столик помещают исследуемый препарат и закрепляют его клеммами;
4. Под тубус помещают нужный объектив и с помощью макро и микро винтов устанавливают фокусное расстояние. Так, при работе с иммерсионными объективами на препарат предварительно наносят каплю иммерсионного масла и осторожно опускают тубусодержатель макро винтом до соприкосновения со стеклом. Затем, внимательно смотря в окуляр, очень медленно поднимают тубусодержатель, вращая его про-

тив часовой стрелки, до тех пор, пока не увидят изображение. Точную наводку объектива на фокус производят микрометрическим винтом. При работе с сухими объективами препарат вначале рассматривают с объективом х8. Поднимая с помощью макровинта тубусодержатель и внимательно смотря в окуляр, устанавливают фокусное расстояние (около 9 мм) и добиваются четкости изображения, используя микрометрический винт. Далее, двигая предметный столик или предметное стекло, устанавливают в центр поля тот участок препарата, в котором лучше всего виден изучаемый объект. Затем, вращая револьверное устройство вокруг своей оси, под тубус помещают объектив на х20 или х40. При этом под тубус не должен попасть объектив х90. В револьверном устройстве объективы располагаются таким образом, что если найдено изображение с объективом х8, то при рассмотрении препарата с объективами большего увеличения нужно слегка подрегулировать четкость изображения с помощью макро- и микрометрических винтов;

5. Во время микроскопирования необходимо держать оба глаза открытыми и пользоваться ими попеременно;
6. После окончания работы следует убрать препарат с предметного столика, опустить вниз конденсор, поставить под тубус объектив х8, удалить мягкой тканью или марлей, смоченной в спирте, иммерсионное масло с фронтальной линзы объектива х90, под объектив положить марлевую салфетку, опустить тубусодержатель.

2 Виды микроскопии

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

$\sin \alpha$ - числовая апертура, где n –показатель преломления светом оптической среды, α - апертурный угол объектива.

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

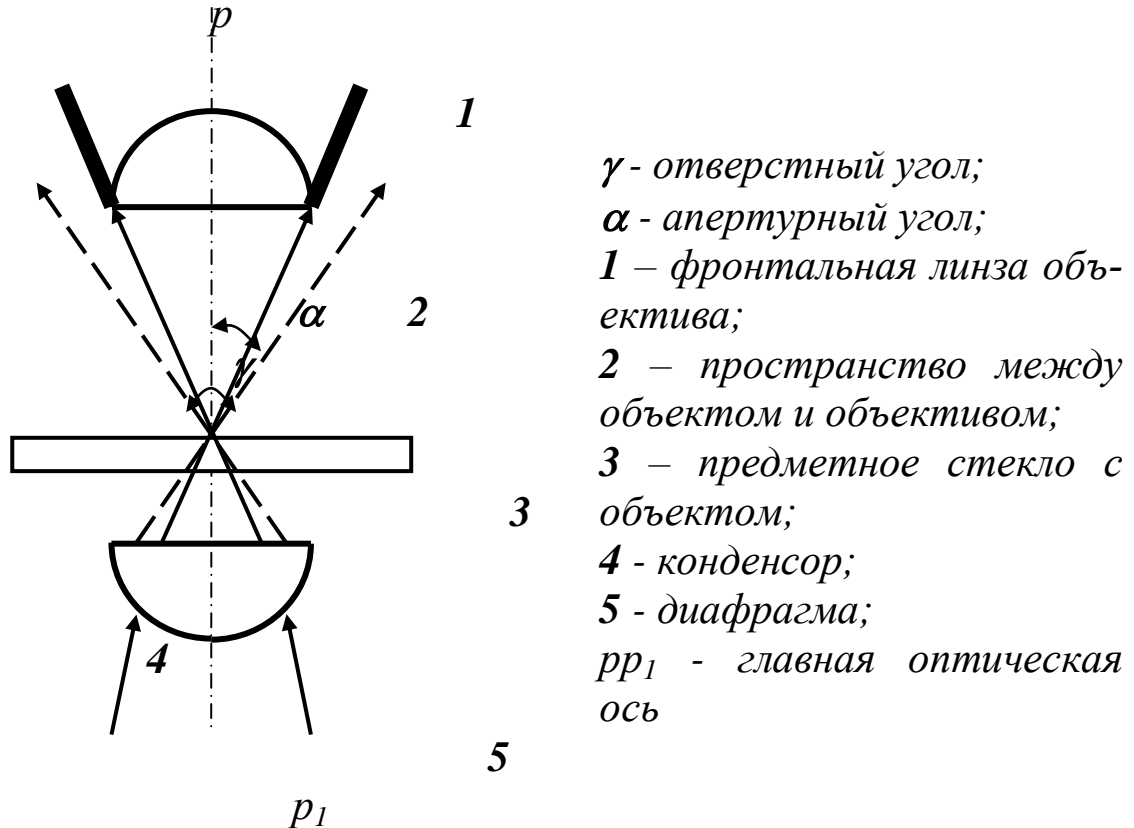


Рис. 2 Схема, иллюстрирующая понятие апертурного угла

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

Таким образом, повысить разрешающую способность микроскопа можно путем:

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

Микроскопия в темном поле

Используется для исследования слишком малых и слабоконтрастных живых объектов. При микроскопии этим методом используют специальный кон-

денсор темного поля, центр которого затемнен. Поэтому центральный пучок световых лучей не попадает в объектив и поле зрения микроскопа остается темным. Объект освещается только лучами, попадающими на него под углом. Рассеиваясь на объекте, часть лучей изменяет направление и попадает на объектив. Объект становится видимым как светящаяся точка на темном фоне. Метод темного поля позволяет получить представление о внешней форме живых неокрашенных объектов и их движении.

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

Фазово-контрастная микроскопия

Дает возможность изучать живые объекты без окраски и фиксирования. Глаз человека реагирует на изменения амплитуды световой волны (интенсивность, контрастность) и ее длины (цвет), но не воспринимает различий по фазе. В биологических препаратах чередуются места, которые в разной степени поглощают свет. Проходя через них, световые волны изменяют свою амплитуду. Такие участки объекта называют амплитудными, и под микроскопом они выглядят более темными. Прозрачные в видимом свете структурные элементы объектов пропускают лучи одинаковой длины и амплитуды, но смещают их фазу. Величина смещения зависит от толщины и показателя преломления структур, но видимых изменений практически не дает. Такие препараты являются неконтрастными.

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

Фазово-контрастное устройство дает возможность изучать структуры клеток: жгутики и оболочки бактерий, ядра и митохондрии дрожжей и грибов. Таким образом, *хотя разрешающая способность при использовании фазово-контрастной микроскопии не меняется при сравнении со светопольной, качество изображения улучшается за счет повышения контрастности.*

Люминесцентная микроскопия

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

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

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

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

Электронная микроскопия

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

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

Высокая разрешающая способность современных электронных микроскопов позволяет наблюдать и изучать объекты, невидимые в оптических мик-

роскопах: вирусы и фаги, микоплазмы, строение клеток прокариотов и эукариотов, их макро- и микроструктурные элементы. Препараты для электронной микроскопии готовят в виде очень тонких срезов на специальных ультрамикротоммах или на тончайших пленках – подложках из коллодия. Следовательно, в электронных микроскопах микроорганизмы исследуют не в живом состоянии, а в виде фиксированных препаратов.

Ход работы

На занятии студенты знакомятся с устройством микроскопа и правилами работы с ним, видами микроскопии, основными особенностями их устройства и принципами их работы. Затем они осваивают технику микроскопирования с использованием готовых препаратов.

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

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

Оформление и анализ результатов исследований

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

Контрольные вопросы

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

Лабораторная работа №2

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

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

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

Осваивают технику отбора чистых культур микроорганизмов и методику приготовления фиксированных препаратов бактерий. Готовят фиксированные препараты из чистых культур (*Staphylococcus albus*, *Sarsina flava*) и естественных мест обитания (кефира). Далее окрашивают эти препараты простыми методами (чистые культуры – фуксином, а кефир – краской Муромцева) и рассматривают их с использованием иммерсионной системы с объективом x90 или x100 при максимальном освещении.

Задание 1. *Техника отбора чистых культур микроорганизмов*

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

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

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

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

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

Задание 2. Приготовление препаратов фиксированных клеток

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

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

Приготовление фиксированных препаратов ведут в следующей последовательности:

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

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

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

Задание 3. Окраска фиксированных препаратов микроорганизмов простыми методами

Фиксированные препараты нельзя рассмотреть под микроскопом, так как они являются бесцветными и пропускают световые лучи. Поэтому их окрашивают, используя простые или сложные методы.

При окрашивании фиксированных мазков простыми методами используют один краситель (фуксин, краска Муромцева, генцианвиолет, метиленовая синь и др.).

Последовательность окрашивания мазка простыми методами, следующая:

1. На фиксированный препарат наносят несколько капель красителя таким образом, чтобы он покрывал всю поверхность мазка и выдерживают в течение определенного времени. Так, при окраске фуксином на мазок наносят несколько капель красителя и выдерживают его на маз-

ке 2...3 мин. При окрашивании препарата из кефира на него краску Муромцева наносят на мазок через полоску фильтровальной бумаги на 3...5 мин.

2. Краску смывают с мазка слабой струей до бесцветной смывной воды. При этом стекло держат в наклонном положении над лотком.
3. Мазок подсушивают фильтровальной бумагой, которую осторожно прикладывают к стеклу, и досушивают на воздухе.
4. На окрашенный мазок наносят каплю иммерсионного масла и рассматривают препарат с объективом x90 или x100.

Задание 4. *Окраска бактерий по методу Грама*

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

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

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

Техника окраски по Граму

1. На предметном стекле готовят фиксированный мазок исследуемой чистой культуры;
2. Мазок окрашивают красителем генцианвиолетом через полоску фильтровальной бумаги. Можно также использовать заранее приготовленные фильтровальные бумажки, смоченные 1 %-ным спиртовым раствором кристаллвиолета и высушенные (метод Грама в модификации А.В. Синева). В этом случае бумажки помещают на фиксированный мазок и смачивают несколькими каплями воды. Окраску препарата проводят в течение 2...3 мин;

3. Фильтровальную бумагу снимают с мазка, краску сливают и наносят на мазок раствор Люголя на 2 мин;
 4. Раствор Люголя сливают с мазка и обрабатывают 96 %-ным спиртом в течение 30...60 сек. Затем препарат промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой;
 5. Мазок окрашивают красителем фуксином 2...3 мин, второй раз промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой.
- Затем на стекло наносят каплю иммерсионного масла и рассматривают препарат с объективом x90 или x100 при максимальном освещении.

Оформление и анализ результатов исследований

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

Контрольные вопросы

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

Лабораторная работа №3

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

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

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

Краткие теоретические положения

Морфология и культуральные признаки микроскопических грибов

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

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

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

Все микроскопические грибы могут размножаться вегетативно кусочком мицелия.

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

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

Культуральные признаки микроскопических грибов

Колонии микроскопических грибов по размерам во много раз превосходят колонии одноклеточных организмов (бактерий, грибов) и нередко разрастаются по всей поверхности питательной среды в чашках Петри. Консистенция грибных колоний различная. Чаще образуются войлокообразные и кожистые колонии, реже крошковатые. Поверхность колоний может быть пушистой, как вата, бархатистой, муч-

нистой, паутинообразной, нитевидной, кожистой или гладкой. При росте на плотных и жидких средах часть гифов врастает в питательную среду, образуя *субстратный* мицелий, а другая часть гифов образует *воздушный* мицелий в виде пушистого налета, видимого невооруженным глазом. Мицелий может быть также бесцветным (белым, сероватым) или окрашенным (черным, бурым, зеленым, желтым и т.д.). Пигментирован только плодоносящий мицелий.

Характеристика микроскопических грибов различных классов

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

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

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

К роду *Penicillium* относится около половины всех плесневых грибов. Они широко распространены в почве, в воздухе плохо проветриваемых помещений и вызывают порчу различных продуктов и материалов. Этот гриб имеет ветвящийся септированный мицелий (диаметр гифов – 2...3 мкм) и септированные конидиеносцы (напоминают кис-

точки), которые на конце разветвляются в виде отростков – стеригм. От них отходят конидии, состоящие из цепочек спор. В зависимости от вида конидии могут быть разного цвета (белые, зеленые и др.). Многие пенициллы используются в промышленности для получения различных ценных продуктов. Среди выделенных штаммов этого рода 25 % обладают антибиотической активностью, а такие виды как *Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum* используются как продуценты пенициллина. Некоторые виды пенициллов используются как продуценты ферментов и липидов. В производстве мягких сыров рокфор и камамбер используются благородные плесени *Penicillium roqueforti* и *Penicillium camamberti*.

Грибы рода *Aspergillus* насчитывают более 200 видов. Эти грибы имеют хорошо развитый ветвящийся мицелий с многочисленными септами. Конидиеносцы несептированы, верхние их концы грушевидно или шаровидно расширены в виде небольшой головки. На головке располагаются кеглеобразные стеригмы с цепочками конидий, которые напоминают струйки воды, выливающиеся из лейки. Отсюда возникло название «леечная плесень» (*aspergere* по латыни – поливать, опрыскивать). Конидии аспергиллов при созревании приобретают различную окраску, что наряду с другими признаками определяет их видовую принадлежность.

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

Грибы рода *Alternaria* относятся к классу несовершенных грибов – дейтеромицетов. Это высшие грибы. Они имеют септированный мицелий и короткие несептированные конидиеносцы, на которых находятся многоклеточные конидии грушевидной или лимоновидной фор-

мы. Гриб является возбудителем черной гнили – болезни корнеплодов и плодов, а также возбудителем порчи пищевых продуктов.

Морфология дрожжей и их характеристика

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

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

Морфологически дрожжи разнообразны. Они отличаются друг от друга размерами и формой клеток. Размеры клеток дрожжей в зависимости от вида варьируют в следующих пределах; от 2,5 до 10 мкм в поперечнике и от 4 до 20 мкм в длину.

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

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

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

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

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

Порядок выполнения работы

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

Задание 1. Приготовление препаратов типа «раздавленная капля»

1. На предметное стекло трубочкой или пипеткой наносят большую каплю воды или этилового спирта;
2. Зажигают спиртовку, прокалывают препаративную иглу над пламенем горелки и отбирают небольшое количество мицелия из пробирки или чашки Петри, соблюдая правила асептики;
3. Мицелий аккуратно помещают в каплю, нанесенную на предметное стекло и с помощью двух игл расправляют его в воде;

4. Препарат накрывают покровным стеклом и слегка придавливают. Излишки воды удаляют с помощью фильтровальной бумаги.
5. Микроскопируют препарат «раздавленная капля» сначала с объективом х8, а затем х40 в затемненном поле зрения (конденсор опущен, шторка ирис-диафрагмы прикрыта).

При отборе и микроскопии препаратов грибов учитывают следующие рекомендации:

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

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

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

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

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

Оформление и анализ результатов исследований

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

Контрольные вопросы

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

Лабораторная работа №4

Культивирование микроорганизмов. Типы питательных сред и их приготовление.

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

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

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

Теоретический материал.

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

Понятие о чистой и накопительной культуре микроорганизмов

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

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

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

Перед выделением чистой культуры из различных объектов окружающей среды (пищевого продукта, с поверхности плодов и овощей, из почвы, воды и др.), в которых находится множество микроорганизмов, вначале получают накопительные культуры, проводя культивирование в *элективных условиях* - условиях, способствующих развитию одной культуры и ограничивающих развитие сопутствующих микроорганизмов. Обеспечить элективные условия для микроорганизмов можно только в том случае, если известны особенности обмена веществ выделяемого микроорганизма. Так как различные микроорганизмы используют различные источники питания, то элективные условия легче всего обеспечить, подбирая определенный состав питательных сред. Можно создать элективные условия, обеспечивая соответствующую температуру, рН, освещение и др.

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

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

Методы выделения накопительных культур микроорганизмов

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

Методы обогащения

Их часто применяют для выделения чистых культур микроорганизмов (например, бактерий группы кишечной палочки (БГКП), сальмонелл и др.) из материалов, в которых мало выделяемых микроорганизмов, но содержится большое количество сопутствующей микрофлоры. Для увеличения численности выделяемого вида микроорганизмов вначале делают посев исследуемого материала в накопительные питательные среды, которые содержат вещества, стимулирующие его рост и угнетающие или задерживающие размножение сопутствующей микрофлоры. Например, для выделения сальмонелл проводят посев в среды обогащения Кауфмана, Мюллера и др., для выделения БГКП – на среду Кесслера. При выделении культур молочнокислых бактерий из почвы, сырого молока или растений посева делают на стерильное обезжиренное молоко, содержащее 5 % этилового спирта для подавления роста гнилостных бактерий.

Метод нагревания

Применяют для выделения чистых культур споровых форм бактерий (бацилл, клостридий). В этом случае перед посевом исследуемый материал прогревают на водяной бане при температуре 75...85 °С в течение 20...30 мин. Вегетативные формы погибают во время про-

гревания, а споры микробов остаются живыми и при последующих посевах на плотную среду прорастают, формируя колонии.

Метод выделения подвижных форм бактерий (метод Шукевича)

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

Методы выделения анаэробных микроорганизмов

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

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

Методы выделения чистых культур микроорганизмов

Метод Пастера (метод предельных разведений)

Заключается в том, что из исследуемого материала делают ряд последовательных разведений в жидкой питательной среде. Для этого каплю посевного материала вносят в пробирку со стерильной жидкой средой, из нее каплю переносят в следующую пробирку и так засевают до 8...10 пробирок. С каждым разведением количество микробных клеток, попадающих в среду, будет уменьшаться и можно получить такое разведение, в котором во всей пробирке со средой будет находиться только одна микробная клетка, из которой разовьется чистая

культура микроорганизма. Так как в жидких средах микробы растут диффузно, т.е. легко распределяются во всей среде, то изолировать одну микробную клетку от другой трудно. Таким образом, метод Пастера не всегда обеспечивает получение чистой культуры. Поэтому в настоящее время этот метод используется, главным образом, для предварительного уменьшения концентрации микроорганизмов в материале перед посевом его в плотную среду для получения изолированных колоний.

Методы механического разделения микроорганизмов с использованием плотных питательных сред

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

Исследуемый материал вносят бактериологической петлей или пастеровской пипеткой в пробирку с расплавленной плотной питательной средой. Равномерно размешивают содержимое пробирки, вращая ее между ладонями. Каплю разведенного материала переносят во вторую пробирку, из второй – в третью и т.д. Содержимое каждой пробирки, начиная с первой, выливают в стерильные чашки Петри. После застывания среды в чашках, их помещают в термостат для культивирования. Для выделения анаэробных микроорганизмов по методу Коха необходимо ограничить доступ кислорода к культуре. С этой целью поверхность глубинного посева в чашке Петри заливают стерильной смесью парафина и вазелина (1:1). Можно также оставлять посевной материал, тщательно перемешанный с агаризованной средой, непосредственно в пробирке. Ватную пробку при этом заменяют резиновой или заливают поверхность агара смесью парафина и вазелинового масла. Чтобы извлечь выросшие колонии анаэробных микроорганизмов, пробирки слегка нагревают, быстро вращая над пламенем горелки. Агар, прилегающий к стенкам, расплавляется, и столбик легко выскользывает в подготовленную чашку Петри. Далее столбик с агаром разрезают стерильным скальпелем, колонии извлекают стерильной петлей или стерильной капиллярной рубкой и переносят в жидкую среду.

Метод Дригальского основан на механическом разделении микробных клеток на поверхности плотной питательной среды в чашках Петри. Каждая микробная клетка, фиксируясь в определенном месте,

начинает размножаться, образуя колонию. Для посева по методу Дригальского используют несколько чашек Петри, залитых плотной питательной средой. На поверхность среды вносят каплю исследуемого материала. Затем с помощью стерильного шпателя эту каплю распределяют по всей питательной среде (посев газоном).



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

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

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

Метод выделения чистых культур с помощью химических веществ используется при изолировании культур микроорганизмов, устойчивых к определенным химическим веществам. Например, с помощью этого метода можно выделить чистую культуру туберкулезных микобактерий, устойчивых к действию кислот, щелочей и спирта. В этом случае исследуемый материал перед посевом заливают 15 % раствором кислоты или антиформинном и выдерживают в термостате в течение 3...4 часов. После воздействия кислоты или щелочи клетки ту-

беркулезной палочки остаются живыми, а все другие микроорганизмы, содержащиеся в исследуемом материале, погибают. После нейтрализации кислоты или щелочи обработанный материал высевают на плотную среду и получают изолированные колонии возбудителя туберкулеза.

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

Ход работы:

Задание 1 *Приготовление посуды для проведения микробиологического анализа*

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

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

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

Задание 2 *Приготовление питательных сред из промышленно выпускаемых сухих сред*

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

анаэробных микроорганизмов (среда для определения КМАФАнМ), среду Эндо и др.

Задание 3 *Приготовление питательных сред.*

Ход работы:

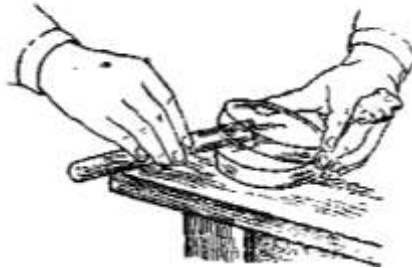
Мясопептонный бульон (МПБ)- жидкая питательная среда. Для его приготовления к 1 л мясной воды добавляют 1 % пептона, 0,5 % химически чистой поваренной соли и кипятят. Мясная вода имеет слабокислую реакцию, поэтому МПБ подщелачивают — добавляют небольшое количество 10—15%-го раствора КОН или NaOH, кипятят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

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

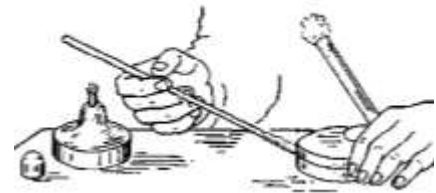
Задание 4 *Техника посева и пересева микроорганизмов на питательные среды*

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

Посев на плотные среды в чашки Петри



Правила разливания питательной среды в чашки Петри



Посев на агар в чашки Петри

Посев в чашки Петри производят следующим образом: плотную питательную среду в пробирках или колбах расплавляют на кипящей водяной бане, охлаждают до 48-50 °С и, соблюдая правила асептики, разливают ровным слоем толщиной 3 – 5 мм в стерильные чашки. Посев делают стеклянным шпателем (Дригальского) или петлей в виде параллельных или зигзагообразных (метод истощающего посева) штрихов.

Посев в жидкую питательную среду

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

Пересев на плотные питательные среды в пробирках

1. Пробирки с культурой и питательной средой помещают на два пальца левой руки в наклонном положении. В правой руке большим и указательным пальцем держат бактериальную петлю и стерилизуют в пламени горелки;
2. Вынимают ватные пробки из обеих пробирок, прижимают их к ладони мизинцем и безымянным пальцами правой руки и обжигают края про-

- бирок. Следят за тем, чтобы пробки не касались посторонних предметов;
3. Петлю вводят в пробирку с пересеваемой микробной культурой. Осторожно, не касаясь стенок, отбирают каплю жидкой культуры. Если производят пересев с косога слоя агара, то для охлаждения петли вначале следует прикоснуться к поверхности агара, где нет культуры, после чего берут небольшое количество микробной массы со скошенной питательной среды;
 4. Вводят петлю с материалом в пробирку со стерильной жидкой средой, стараясь не задевать стенок пробирки. При посеве на скошенные питательные среды петлю с клетками микроорганизмов опускают почти до дна, где скапливается небольшое количество конденсационной воды. Слегка касаясь петлей поверхности плотной среды, но не разрыхляя ее, проводят от дна вверх штрих;
 5. Петлю вынимают, обжигают края пробирок и внутренние концы пробок, после чего пробирки закрывают;
 6. Петлю вновь прокалывают в пламени горелки.

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

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

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

4. Для выделения молочнокислых бактерий из сырого молока 0,5 мл молока вносят стерильной пипеткой в пробирку со стерильным обезжиренным молоком с добавлением 5 % этилового спирта. Далее

пробирки помещают в термостат с температурой 30 0С и проводят культивирование в течение суток.

Контрольные вопросы

1. Что такое питательные среды?
2. Микроорганизмы, которые встречаются в пищевых продуктах, являются хемоорганогетеротрофами. Что это значит?
3. Охарактеризуйте пищевые потребности хемоорганогетеротрофов.
4. Какие требования предъявляются к питательным средам?
5. Каким образом готовятся плотные питательные среды и для чего они используются?
6. Почему в качестве уплотнителя для питательных сред лучше использовать агар-агар, а не желатин?
7. На какие группы делятся питательные среды по происхождению и составу?
8. Что такое синтетические среды и в каких случаях они применяются?
9. Для каких целей используются универсальные, избирательные и дифференциально-диагностические среды?
10. Приведите примеры универсальных, избирательных и дифференциально-диагностических питательных сред.
11. Что такое стерилизация? Какие методы стерилизации Вам известны?
12. Какими способами можно стерилизовать посуду?
13. Какими из известных Вам способов можно стерилизовать питательные среды?
14. Перечислите основные этапы пересева микроорганизмов из пробирки в пробирку.

Лабораторная работа №5

Изучение биохимических свойств микроорганизмов.

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

Оборудование, материалы: среды Гисса, с добавлением углеводов-субстратов (глюкоза, лактоза, манноза, сахароза, галактоза и др.) и одного из индикаторов (ВР, Андрэде, метиловый красный). Обезжиренное молоко, чашки Петри, желатин, ацетата свинца, бульон Хот-

тингера, бульон с 0,1% L-триптофана, реактив Эрлиха, этанол, соляная кислота, среда Кристенсена, МПБ

План

1. Биохимические (ферментативные) свойства микроорганизмов.
 - 1.1. Выявление сахаролитической активности.
 - 1.2. Выявление протеолитической активности и активности других ферментов.
 - 1.3. Определение гемолитической активности.
2. Принципы идентификации микроорганизмов.

Вопросы для изучения

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

Задания для студентов.

Задание 1. Изучение сахаролитической активности микроорганизмов.

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

Ход работ:

1. Изучение сахаролитической активности микроорганизмов.

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

2. Тесты на гидролиз казеина, на желатиназу, на сероводород, индол, аммиак, уреазу, на редукцию нитратов, на каталазу, на оксидазу, на редуцирующую способность бактерий.

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

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

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

Тест на индол: исследуемую культуру целесообразно выращивать на средах, богатых триптофаном, при расщеплении которого образуется индол (бульон Хоттингера, бульон с 0,1% L-триптофана). К выра-

щенной культуре добавляют 1...3мл эфира, встряхивают, отстаивают и вносят 0,5 мл реактива Эрлиха (парадиметиламинобензоальдегид-1 г, 96%-й этанол - 95 мл, соляная кислота - 20 мл). Через 5 мин учитывают результат. Появление на границе эфира и питательной среды красно-фиолетового окрашивания свидетельствует о наличии индола.

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

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

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

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

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

Тест на редуцирующую способность бактерий (в метиленовом молоке) основан на следующей особенности: при окислительно-восстановительных реакциях у бактерий акцептором водорода может

быть кроме молекулярного кислорода ряд органических красителей, которые, присоединяя водород, восстанавливаются и обесцвечиваются. Такие свойства отмечены у лакмусовой настойки, метиленового синего, малахитового зеленого и т. д.. Например, молоко с метиленовым синим готовят так: молоко подщелачивают 10%-м раствором карбоната натрия до рН 7,2 и добавляют 20 мл 1%-го водного раствора метиленового синего на 1000 мл. Готовая среда голубого цвета. Результат учитывают через сутки инкубирования посевов. В случае редукции красителя среда окрашена в кремовый цвет.

Термины и определения

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

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

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

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

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

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

Лабораторная работа №6

Санитарно-гигиенический контроль на предприятиях отрасли

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

Теоретический материал.

Организация санитарно-гигиенического контроля на предприятиях пищевой промышленности.

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

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

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

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

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

Внутриведомственный санитарный контроль осуществляют ведомственная санитарная служба и заводская лаборатория. Они контролируют выполнение требований СанПиНа для предприятий пищевой промышленности, регулярно следят за санитарным состоянием производства, за профилактическими обследованиями работников цехов и соблюдением ими правил личной гигиены. Результаты проведения санитарно-гигиенического контроля фиксируются в специальном журнале.

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

Оценка санитарного состояния воздуха производственных помещений

Воздух производственных помещений может стать источником микробного загрязнения молочных продуктов.

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

Для определения микроорганизмов в воздухе используют седиментационный и аспирационный методы.

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

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

Помимо нормируемых микробиологических показателей в воздухе производственных цехов и холодильниках на предприятиях пище-

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

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

Оценка санитарного состояния воды

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

Для оценки санитарного состояния воды в ней определяют общее микробное число – не более 50 КОЕ/см³; термотолерантные колиформные бактерии – не допускаются в 100 см³; общие колиформные бактерии также должны отсутствовать в 100 см³; споры сульфитредуцирующих клостридий - не допускаются в 20 см³; колифаги – в 100 см³. Исследование питьевой воды проводят один раз в квартал при пользовании городским водопроводом и один раз в месяц при наличии собственных источников водоснабжения в воде.

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

К общим колиформным бактериям относятся граммотрицательные не образующие спор палочки, не обладающие оксидазной активно-

стью, ферментирующие лактозу или маннит с образованием альдегида, кислоты и газа при температуре 37⁰С в течение 24 часов.

Термотолерантные колиформные бактерии обладают всеми признаками общих колиформных бактерий, которые, кроме этого способны ферментировать лактозу до кислоты и газа при температуре 44⁰С в течение 24 часов.

Сульфитредуцирующие клостридии (преимущественно *Clostridium perfringens*) – спорообразующие анаэробные палочковидные бактерии, редуцирующие сульфит натрия на железо-сульфитном агаре в течение 24 часов при температуре 44⁰С.

Колифаги – бактериальные вирусы, способные лизировать кишечную палочку и формировать зоны лизиса через 18±2 часа при температуре 37⁰С на ее газоне на питательном агаре. Колифаги – индикаторы очистки питьевой воды в отношении энтеровирусов.

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

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

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

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

организмов в смывной воде не должно превышать их содержания в чистой воде, поступающей на мойку. Кишечные палочки должны в смыве отсутствовать. Количество слизеобразующих бактерий не должно быть более 0-5 в 1 мл смыва.

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

Контроль трубопроводов, рукавов, шлангов

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

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

Контроль посуды и инвентаря

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

Контроль вспомогательных и упаковочных материалов

Пергамент, фольгу, пленку, комбинированные материалы для упаковки молока и молочных продуктов разворачивают и с внутренней

стороны берут смыв стерильным ватным тампоном (со 100 см³ поверхности). Определяют наличие микроскопических грибов и наличие кишечной палочки. Кишечная палочка в смывах должна отсутствовать, а содержание плесеней не должно превышать 5 в 1 см³ смыва.

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

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

Контроль чистоты рук и спецодежды работников

Анализ чистоты рук работников производят (без предварительного предупреждения) перед началом производственного процесса только у рабочих, которые непосредственно соприкасаются с чистым оборудованием или продукцией.

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

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

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

Чистоту рук можно проверить также с помощью индикаторных бумажек для определения бактерий группы кишечной палочки. Для этого индикаторную бумажку смачивают в стерильной воде и накладывают на руку. Затем бумажку помещают в пакет, запаивают и термостатируют в течение 12 часов при 37⁰С. Появление розовых пятен свидетельствует о присутствии БГКП.

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

Задание 1. Провести дезинфекцию рабочего места раствором хлорамина.

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

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

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

Методические указания: с помощью тампонов обрабатывают часть поверхности лабораторного стола размером 10 x 10 см. После этого другим тампоном, смоченным в растворе KI с крахмалом, проводят по обработанной поверхности. Специфическое окрашивание по-

верхности в этом месте говорит о применении для дезинфекции хлорсодержащих препаратов.

Задание 3. Бактериологический контроль дезинфекции путем смыва с поверхностей

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

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

Задание 4. Контроль чистоты рук

Техническое оснащение: чашки Петри с МПА.

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

Задание 5. Бактериологическое исследование воздуха.

Техническое оснащение: Чашки Петри с МПА, аппарат Кротова.

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

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

Учет роста на чашках производят на следующем занятии.

Лабораторная работа №7

Исследование производственных дрожжей

Цель работы: Ознакомиться с морфологическими, свойствами дрожжей. Изучить микрофлору, сопутствующую производственным дрожжам. Изучить микробиологические методы контроля качества

производственных дрожжей, применяемых при производстве хлеба. Научиться определять концентрацию дрожжевых клеток с помощью счетной камеры Горяева, определять подъемную силу и кислотность дрожжей, процентное содержание мертвых клеток дрожжей.

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

Теоретический материал

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

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

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

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

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

Различают дрожжи верхового и низового брожения.

Дрожжи, используемые в хлебопекарном производстве

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

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

Требования, предъявляемые к хлебопекарным дрожжам:

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

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

Должны обладать высокой бродильной энергией (мальтазной и зимазной активностью). *Мальтазная активность* – это время (в мин), необходимое для выделения 10 см³ СО₂ при сбраживании 10...20 см³ мальтозы при 30 °С дрожжами, взятыми в количестве 2,5 % к объему среды. Мальтазная активность характеризует способность дрожжей гидролизовать мальтозу муки и зависит от активности содержащегося в дрожжах фермента мальтазы. Мальтазная активность дрожжей хорошего качества должна быть не более 100 мин. *Зимазная активность* – это время (в мин), необходимое для выделения 10 см³ СО₂ при сбраживании 10...20 см³ глюкозы при 30 °С дрожжами, взятыми в количестве 2,5 % к объему среды. Зимазная активность дрожжей хорошего качества должна быть не более 60 мин. О бродильной активности хлебопекарных дрожжей можно также судить по их *подъемной силе* – периоду времени (в мин), в течение которого тесто, замешанное на испытуемых дрожжах, поднимается до определенного уровня в формочке. Все эти показатели относятся к **технологическим показателям качества** хлебопекарных дрожжей;

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

Микрофлора производственных дрожжей

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

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

Молочнокислые бактерии чаще других микроорганизмов встречаются в производственных дрожжах. Они принадлежат к трем родам: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*. Стрептококки и лейконостоки имеют шаровидную форму клеток. Стрептококки располагаются друг относительно друга попарно, короткими и длинными цепочками, а лейконостоки в основном попарно. Отличием этих двух родов друг от друга является то, что лейконостоки в отличие от стрептококков образуют слизистые капсулы. Лактобациллы являются палочковидными бактериями, которые в зависимости от вида могут располагаться по одиночке или короткими цепочками. Общими признаками этих бактерий являются грамположительная окраска, отсутствие спорообразования, каталазу они не образуют, не восстанавливают нитраты в нитриты, являются факультативными анаэробами. Молочнокислые стрептококки хорошо развиваются в средах, содержащих 3...6 % спирта, а палочковидные формы молочнокислых бактерий не теряют своей активности даже при 10...12 % спирта.

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

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

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

Дикие дрожжи, принадлежащие к роду Saccharomyces

В чаще всего встречаются следующие разновидности диких дрожжей-сахаромицетов: *S. diastaticus*, *S. pastorianum*, *S. bayanus*, *S. ellipsoideus*. В настоящее время все эти дрожжи принято относить к одному виду *Saccharomyces cerevisiae*, так как с точки зрения систематики различия в их признаках не являются существенными для разграничения видов. Клетки этих дрожжей имеют овальную или эллиптическую форму. Размножаются в основном почкованием, но могут и спорообразованием. Факультативные анаэробы. Активно сбраживают сахара. Оптимальная температура развития 27-35 °С, рН – от 3,5 до 5,0.

Дикие дрожжи, не относящиеся к роду Saccharomyces

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

Дрожжи рода *Candida* имеют круглые, овальные или яйцевидные, а иногда удлиненные или неправильные формы клеток. Морфология клеток непостоянна и существенно меняется в зависимости от ус-

ловий культивирования и питательной среды. Спор не образуют. На жидких средах развиваются преимущественно на поверхности в виде белой или сероватой пленки. Некоторые виды являются факультативными анаэробами, а другие – аэробами. Размножению большинства видов способствует присутствие в среде кислорода. Некоторые дрожжи этого вида продуцируют специфический белок, губительно воздействующий на культурные дрожжи (дрожжи-убийцы).

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

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

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

Дрожжи рода *Brettanomyces* имеют клетки эллиптические, а также цилиндрические, удлинённо-продолговатые, нередко стрелозаостренные с одного конца. Образуют псевдомицелий. Спор не образуют. Являются факультативными анаэробами. Плохо сбраживают сахара. На жидких средах образуют хлопьевидный или вязкий осадок, могут образовывать тонкую пленку. Многие виды устойчивы к высоким концентрациям спирта.

Помимо вышеперечисленных групп микроорганизмов, инфицирующих производственные дрожжи, в них могут присутствовать **гнилостные бактерии**. Это спорообразующие грамположительные бациллы и клостридии и грамотрицательные не образующие спор палочковидные бактерии. Гнилостные бактерии вызывают распад белковых веществ. В аэробных условиях они осуществляют полную минерализацию белка, вплоть до диоксида углерода, аммиака, сероводорода, воды и минеральных солей. В анаэробных условиях гнилостные бактерии образуют различные органические дурнопахнущие и ядовитые вещества. Особую опасность представляют маслянокислые бактерии (*Clostridium butyricum*, *Clostridium pasterianum*, *Clostridium saccharobu-*

tyricum и др.) и нитритобразующие бактерии (например, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*). Маслянокислые бактерии образуют масляную кислоту, а нитритобразующие бактерии превращают нитраты в нитриты. Эти соединения даже в очень малых концентрациях (0,0005 %) подавляют развитие культурных дрожжей.

Микробиологический контроль хлебопекарных прессованных дрожжей включает:

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

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

1. *Определение подъемной силы и кислотности дрожжей*

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

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

Пекарские прессованные и сухие дрожжи вырабатывают на специализированных дрожжевых заводах. Питательной средой при выращивании дрожжей служит осветленная, очищенная, разбавленная водой свекловичная меласса — отход свеклосахарного производства. В ней содержатся необходимые для дрожжей сахара и многие другие питательные вещества; туда дополнительно вводят азот- и фосфорсодержащие соли. Температуру мелассной среды при выращивании дрожжей поддерживают на уровне около 30 °С рН 4,5—5,5. В таких условиях дрожжи дышат, а не бродят; большая часть сахара используется для синтеза веществ клетки, при этом дрожжи активно размножаются. По накоплении определенного количества дрожжевых клеток их отделяют от среды, промывают водой, сгущают и прессуют до содержания влаги 73—75%. Полученную дрожжевую массу формуют в виде брикетов с содержанием дрожжевых клеток в количестве 8-12 млрд в 1г. Брикетки упаковывают в бумагу и охлаждают до температуры 4 °С. Сушеные дрожжи выпускают с влажностью 8-10%.

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

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

Определение подъемной силы дрожжей

На технических весах взвесить 0,31 г дрожжей, перенести их в фарфоровую чашку, добавить 4,8 мл раствора хлорида натрия, нагретого до 35 °С, и тщательно перемешать шпателем или пестиком. К по-

лученному раствору добавить 7г муки, замесить тесто и придать ему форму шарика.

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

Задание 1. Определение кислотности дрожжей

На технических весах взвесить 10 г дрожжей. Навеску перенести в сухую фарфоровую чашку или стакан, добавить 50 мл дистиллированной воды, тщательно перемешать, взбалтывая до получения однородной массы. Полученную смесь оттитровать 0,1М раствором гидроксида натрия в присутствии индикатора фенолфталеина до появления розового окрашивания.

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

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

где H - кислотность дрожжей, мг/100г;

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

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

K - поправочный коэффициент 0,1 м раствора NaOH;

100 - переводной коэффициент;

10 - масса дрожжей, г.

Задание 2 Определение процентного содержания мертвых клеток дрожжей

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

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

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

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

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

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

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

счете количество клеток в большом квадрате не должно превышать 20...30, а в малом - 10, в противном случае делают разведение.

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

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

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

a – среднее число клеток в квадрате сетки;

n – разведение дрожжевой суспензии (если оно применялось);

S – площадь квадрата сетки, мм^2 ;

h – глубина камеры.

Пример: При подсчете взвеси дрожжей в камере Горяева обнаружено 20 дрожжевых клеток в одном большом квадрате. Густая взвесь предварительно была разведена 1:100. Следовательно, $M = 20 \cdot 1000 \cdot 25 \cdot 100 / 0,1 = 5,0 \cdot 10^8 \text{ кл/см}^3$.

Оформление и анализ результатов исследований

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

Контрольные вопросы

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

Лабораторная работа №8

Микробиологическое исследование продуктов питания (занятие 1)

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

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

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

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

Теоретическая часть

Кремовые кондитерские изделия

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

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

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

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

Схема разведения пищевого продукта и проведения микробиологического исследования

Для приготовления разведений продукта используют пробирки с 9 см³ стерильной воды. Иногда для приготовления разведений используются стерильные растворы разбавленного фосфатного буфера, изотонического раствора хлорида натрия, пептонной воды или лимоннокислого натрия. В первую пробирку стерильной пипеткой вносят 1 см³ продукта. Новой стерильной пипеткой тщательно перемешивают содержимое пробирки (разведение 1:10). Затем этой же пипеткой из пробирки с разведением 1:10 отбирают 1 см³ жидкости и переносят во вторую пробирку с водой (разведение 1:100). Количество разведений рассчитывают таким образом, чтобы в чашках Петри выросло от 30 до 300 колоний.

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

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

Чашечные методы количественного учета микроорганизмов

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

Учет результатов при использовании чашечных методов

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Перед посевом чашки маркируют.

По 1 см^3 разведений продукта вносят в чашки Петри. Пипетку с посевным материалом держат под углом 45°C , касаясь концом пипетки дна чашки. Затем в каждую чашку наливают по $12-15 \text{ см}^3$ мясопептонного агара или среды для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, расплавленной и охлажденной до 45°C . Сразу после заливки агара содержимое тщательно перемешивают путем легкого вращательного покачивания для равномерного распределения посевного материала. Если ожидают ползучий рост микроорганизмов посевы после застывания агара заливают вторым слоем питательной среды или $3 \dots 5 \text{ см}^3$ водного раствора агара. После застывания среды чашки Петри переворачивают крышками вниз и помещают в термостат при $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 72 часа (допускается предварительный учет через 48 часов с последующим окончательным учетом через 24 часа).

Задание 2. Определение количества грибов и дрожжей

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

Задание 3. Определение протеолитических (гнилостных) бактерий

Соответствующее разведение продукта засевают на молочный агар инкубацию посевов проводят при 30°C в течение 72 часов. Протеолитические бактерии на молочном агаре при своем росте образуют

зоны просветления агара (зоны протеолиза). Пептонизирующие бактерии образуют узкие зоны пептонизации.

Задание 4. Определение коагулазоположительных стафилококков

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

Задание 5. Определение аэробных спорообразующих бактерий рода Bacillus

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

Методы, основанные на накоплении микроорганизмов с последующей их идентификацией

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

К таким методам относятся определение наличия БГКП, сальмонелл.

Определение бактерий группы кишечной палочки

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

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

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

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

Определение сальмонелл

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

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

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

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

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

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

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

Определение анаэробных сульфитредуцирующих клостридий

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

Определение бактерий рода *Proteus*

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

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

Лабораторная работа №9

Микробиологическое исследование продуктов питания (занятие 2)

Студенты исследуют посевы разведений продукта, подсчитывают количество выросших колоний в чашках Петри на мясопептонном агаре или среде для определения мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, среде Сабуро и т.д. Изучают посевы продукта или его разведений в пробирках со средой Кесслера и по-

плавками. Если в пробирках со средой Кесслера газообразования в поплавках не наблюдается, то делают заключение об отсутствии БГКП во взятом на анализ объеме продукта. Полученные данные сравнивают с нормируемым значением. Затем изучают качественный состав микрофлоры исследуемого продукта.

Задание 1. Изучение культуральных свойств выросших в чашках колоний

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

Задание 2. Изучение морфологических свойств микроорганизмов

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

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

Оформление и анализ результатов исследований

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

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

Культуральные и морфологические признаки выросших в чашках колоний

Культуральные свойства	Питательные среды					
	МПА		Среда Сабуро		..	
	
Форма колоний.						
Консистенция.						
Микроскопическая картина						

После заполнения таблицы делается вывод о качественном составе микрофлоры исследованного продукта

Контрольные вопросы

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

12. Какие микробиологические показатели определяются чашечными методами?
13. В чем сущность методов, основанных на накоплении микроорганизмов с последующей идентификацией? Какие микробиологические показатели определяются этими методами?
14. Какими методами определяются КМАФАнМ, наличие БГКП, титр анаэробных сульфитредуцирующих клостридий?
15. Как описываются культуральные свойства выросших в чашках колоний микроорганизмов?

5 семестр

Лабораторное занятие № 1 Микроскопическое исследование мяса

Цель: Ознакомиться с микроскопическим методом исследования мяса.

План

1. Микроскопическое исследование мяса.
2. Анализ полученных данных.

Вопросы для изучения и обсуждения

1. Правила отбора проб мяса для микроскопического исследования.
2. Методика приготовления мазков-отпечатков.
3. Окраска препаратов разными методами.

Задания

Общие:

1. Изучить методики необходимые для проведения микроскопического исследования мяса.

Индивидуальные:

1. Приготовить не менее 2-3 мазков-отпечатков из мяса, высушить, зафиксировать и окрасить по Граму.
2. Промикроскопировать каждый мазок.
3. Результаты исследования занести в тетрадь.

Краткие теоретические и учебно-методические материалы

Из каждой пробы мяса готовят на предметном стекле не менее двух-трех мазков-отпечатков из поверхностных слоев мяса (на глубине 1 см от поверхности) и глубинных слоев (на глубине 2-3 см от поверхности и из центра пробы).

Для приготовления мазка-отпечатка из поверхностного слоя стерильными ножницами или скальпелем, придерживая пинцетом, вырезают кусочек мяса 2-3 г и прикладывают его внутренней срезанной стороной к предварительно профламбированной поверхности предметного стекла.

Для приготовления мазков-отпечатков из глубоких слоев поверхность пробы мяса необходимо вначале простерилизовать (смочить спиртом и обжечь на пламени или прижечь нагретым металлическим шпателем) Затем стерильным инструментом вырезают из глубины небольшие кусочки мяса размером 2x1,5x2,5 см, прикладывают несколько раз свежесрезанный срез к предметному стеклу, т. е. готовят мазки-отпечатки.

Приготовленные мазки-отпечатки высушивают на воздухе, фиксируют над пламенем спиртовки и окрашивают по методу Грама или простым методом.

Просматривают каждый мазок под микроскопом с иммерсионным объективом не менее чем в 25 разных полях зрения микроскопа. При микроскопировании обращают внимание на наличие и количество микробных клеток, подсчитывая отдельно количество кокковых, палочковидных, дрожжевых и других микробных клеток в каждом просмотренном поле зрения и затем вычисляют среднее арифметическое значение их количества в одном поле зрения. Отмечают также наличие или отсутствие в полях зрения микроскопа следов распада мышечной ткани.

В мазках-отпечатках свежего мяса в поле зрения микробных клеток нет или видны единичные клетки кокков или дрожжей (до 10 клеток). Следов распада мышечной ткани не наблюдается.

Для мяса с частично измененной свежестью характерно наличие в поле зрения микроскопа не более 30 кокков, дрожжей или палочковидных клеток. Заметны следы распада мышечной ткани: ядра мышечных волокон в состоянии распада, истерпанность мышечных волокон слабо различима.

В мазках-отпечатках несвежего мяса поле зрения микроскопа усеяно большим количеством микробных клеток (более 30) с преобладанием палочковидных форм. Наблюдается значительный распад мышечной ткани, почти полное исчезновение ядер и полное исчезновение истерченности мышечных волокон.

Тезаурус

Мазки-отпечатки, кляч-препараты, кокки, палочковидные бактерии, грамположительные и грамотрицательные бактерии.

Список литературы

1. Мясо (бактериологический анализ) – ГОСТ 21237-75.
2. Мясо и мясные продукты (обнаружение сальмонелл) – ГОСТ 50455-92.
3. Сидоров М.А., Корнелаева Р.П. Микробиология мяса и мясных продуктов. – М.: Колос, 2000.
4. Сидоров М.А., Нецеплов С.В., Корнелаева Р.П. Практикум по микробиологии мяса и мясных продуктов. – М.: Колос, 2000.

Лабораторное занятие №2 Бактериологическое исследование мяса

- Цель: 1. Ознакомление с методами отбора проб мяса.
2. Изучение схемы и методик бактериологического исследования мяса.

План

1. Ознакомление с методами отбора проб мяса.
2. Подготовка проб мяса к бактериологическому исследованию.
3. Посев образцов мяса на питательные среды для выявления возбудителей зооантропонозов и пищевых отравлений.

Вопросы для изучения и обсуждения

1. В каких случаях проводят бактериологическое исследование мяса?
2. Как отбирают пробы мяса?
3. На присутствие каких групп микроорганизмов проводят микробиологическое исследование мяса?

Задания

Общие:

1. Зарисовать схему бактериологического исследования мяса.

Индивидуальные:

1. Для исследования на двух студентов выдается проба мяса. Им следует приготовить мазки-отпечатки, покрасить по методу Грама и на капсулу, приготовить взвесь из пробы мышечной ткани массой 15г, произвести

высевы на МПА в чашках Петри для определения возбудителей антропонозов, на МПА в пробирках – для выявления палочек протей, на среду ЭНДО – для выявления сальмонелл и бактерий группы кишечных палочек.

2. Ответить на вопросы тест-контроля:

Бактериологическое исследование мяса на наличие условно-патогенной микрофлоры и кокков

1. Для идентификации сальмонелл и кишечной палочки материал высеивают:

- а) на среду Эндо;
- б) на среду Плоскирева;
- в) на среду Китта-Тароцци.

2. На среде Эндо кишечная палочка образует:

- а) вишнево-красные колонии;
- б) бесцветные колонии;
- в) не дают роста.

3. Серологическая типизация бактерий группы кишечной палочки проводится:

- а) в РА и О-антигену;
- б) в РА и О- и Н-антигену;
- в) в РП по Н-антигену.

4. Бактерии группы кишечной палочки:

- а) обладают гемолитической активностью все штаммы;
- б) не обладают гемолитической активностью все штаммы;
- в) гемолитической активностью обладают энтеропатогенные штаммы.

5. При обнаружении кишечной палочки во внутренних органах:

- а) внутренние органы проваривают;
- б) внутренние органы утилизируют, а мясо направляют на колбасы;
- в) выпускают без ограничений.

6. При обнаружении кишечной палочки в мышцах и л/у:

- а) внутренние органы проваривают, туши выпускают без ограничений;
- б) внутренние органы утилизируют, а мясо направляют на колбасы;
- в) выпускают без ограничений.

7. Бактерии рода протей на скошенном МПА:

- а) образуют серо-белые шероховатые с бахромчатыми краями колонии;

- б) растут в виде вуалеобразного налета;
- в) рост не характерен.

8. Для установления патогенности стафилококков:

- а) производят высев ЧК на кровяной агар;
- б) ставят биопробу;
- в) ставят реакцию плазмокоагуляции.

9. В мазках из органов стафилококки:

- а) располагаются в виде цепочек;
- б) в виде скоплений, напоминающих виноградную гроздь;
- в) по одиночке и парами.

10. Стрептококки хорошо растут на:

- а) на средах с добавлением сыворотки крови;
- б) на глюкозо-солевом агаре;
- в) на сахарном бульоне.

Ответы: 1-а, б; 2-а; 3-а; 4-в; 5-а; 6-б; 7-б; 8-а, в; 9-б; 10-в.

Краткие теоретические и учебно-методические материалы

При различных заболеваниях животных их мышцы и внутренние органы нередко бывают обсемененными микроорганизмами, которые могут вызывать у человека инфекционные заболевания или пищевые отравления.

Исследование мяса проводят согласно ГОСТ 21237-75, который распространяется на мясо и субпродукты от всех видов убойных животных и устанавливает методы бактериологического исследования для определения бацилл сибирской язвы, возбудителей листериоза, рожи свиней, сальмонелл, эшерихий, протей, стафилококков, а также патогенных и токсигенных клостридий. Бактериологическое исследование проводят во всех случаях, предусмотренных действующими Правилами ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов и нормативно-технической документацией:

- при подозрении на остропротекающие инфекционные болезни (сибирская язва, листериоз, рожа свиней, лептоспироз, сальмонеллез, злокачественный отек, эмфизематозный карбункул и т. д.);
- во всех случаях вынужденного убоя, независимо от причин убоя;
- при отравлениях;

- при желудочно-кишечных болезнях;
- при обширных ожогах, кровоизлияниях, отеках внутренних органов;
- при наличии гнойных очагов в паренхиматозных органах, обнаружении абсцессов;
- при желтушном окрашивании тканей туш;
- при гнойных нефритах;
- при удалении кишечника из туши позднее, чем через 2 ч после убоя;
- при сомнительной свежести мяса.

Отбор проб

В зависимости от предполагаемого диагноза и характера патологоанатомических изменений для бактериологического исследования направляют: две пробы мышц сгибателя или разгибателя грудкой и газовой конечности туши длиной не менее 8 см, лимфатические узлы вместе с окружающими их соединительной и жировой тканями, селезенку, почку, долю печени с печеночным лимфатическим узлом. Для исследования на листериоз направляют головной мозг, долю печени, почку. Для исследования на возбудителя сибирской язвы направляют лимфатический узел пораженного органа или лимфатический узел, собирающий лимфу с места локализации подозрительного фокуса, отечную ткань, ухо, а у свиней, кроме того, и подчелюстную лимфоузел.

При исследовании полутуш и четвертин направляют кусок мышцы, лимфатические узлы и трубчатую кость.

При исследовании солонины берут две пробы мяса из разных мест, рассол.

Бактериологическое исследование мяса проводят по прилагаемой схеме:



Выявление возбудителей зооантропонозов (на МПА)

Определение подвижности

Отсевы колоний

Выявление возбудителя сибирской язвы

Тест «жемчужное ожерелье»

Выявление листериоза, рожи

Каталаза, гемолиз, биопроба

Рост на ЖСА, реакция плазмокоагуляции

Реакция агглютинации с О- и Н-сыворотками

Выявление анаэробов (среда Китта-Тароцци)

Изучение характера роста, микроскопия

Биопроба

Пробы берут стерильными инструментами. Каждую пробу завертывают в пергаментную бумагу или полиэтиленовую пленку и помещают в пакет, на котором ставят дату отбора пробы, номер туши и направляют в лабораторию в металлическом ящике. В сопроводительном документе указывают вид мяса, номера образцов, причину направления материала, патологоанатомические данные, предполагаемый диагноз, дату взятия образцов.

Бактериологическое исследование мяса начинают с микроскопии мазков-отпечатков, приготовленных из середины исследуемых проб.

Готовят от 2 до 10 мазков-отпечатков из паренхиматозных органов (печени, почек, селезенки), лимфатических узлов туши или из пораженных участков органов и тканей. Препараты высушивают на воздухе, фиксируют и окрашивают одновременно по Граму и 2%-ным раствором сафранина для выявления капсул возбудителя сибирской язвы. При окраске сафранином по методу Ольта вегетативные клетки сибиреязвенных бацилл окрашиваются в кирпично-красный, а капсулы - в светло-желтый цвет.

При обнаружении в мазках-отпечатках грамположительных палочек с обрубленными концами, а при окраске сафранином палочек или цепочек папочек с капсулами дают предварительный ответ о наличии возбудителя сибирской язвы.

Кроме того, проводят высевы из образцов мяса и субпродуктов на питательные среды для выявления в них возбудителей зооантропонозов (бацилл сибирской язвы, листерий и др.), возбудителей пищевых токсикоинфекций (сальмонелл, эшерихий, протей), возбудителей токсикозов (стафилококков) и анаэробов (патогенных и токсигенных клостридий).

Приготовление взвеси

При бактериологическом исследовании каждую пробу освобождают от жировой и соединительной ткани, погружают в спирт и два раза обжигают с поверхности. Затем вырезают стерильными ножницами из глубины различных мест кусочки размером 2,0x2,5x1,5 см, лимфатические узлы разрезают пополам. Затем вес вырезанные кусочки измельчают стерильными ножницами.

Для посева составляют две пробы по 15 г каждая. Одна проба состоит из кусочков мышц и лимфатических узлов, а вторая из кусочков паренхиматозных органов (печени, почек, селезенки).

Каждую пробу помещают в стерильный стакан гомогенизатора, добавляют 15 мл физиологического раствора и измельчают. Гомогенизирование можно заменить растиранием в стерильной ступке измельченных стерильными ножницами проб мяса, лимфатических узлов и паренхиматозных органов, добавляя 15 мл физиологического раствора.

Полученные взвеси отстаивают в течение 10 мин. В 1 мл полученной взвеси содержится 0,5 г продукта.

Для выявления возбудителей зооантропонозов из верхней части надосадочной жидкости пипеткой Пастера или бактериологической петлей вносят 1-2 капли или одну петлю на поверхность МПА в чашках Петри и тщательно распределяют стеклянным шпателем.

Для выявления бактерий группы кишечных палочек (БГКП) проводят посев аналогичным методом на одну из дифференциально-диагностических сред (Эндо, Левина, Плоскирева).

Среда Эндо включает агар, лактозу, основной фуксин, сульфат натрия, фосфат натрия. В готовом виде имеет розовый цвет. Колонии лактозоположительных штаммов - красные, лактозоотрицательных - бесцветные или слегка розовые.

Среда Левина включает агар, лактозу, раствор метиленового синего, эозин и двузамещенный фосфорнокислый калий. В готовом виде имеет фиолетовый цвет. Колонии эшерихий - синего или черного цвета, сальмонелл - бесцветные.

Агар Плоскирева состоит из агара с желчными солями, цитрата натрия, тиосульфата натрия, лактозы, фосфата натрия, нейтрального красного, бриллиантового зеленого, йода, хлорида натрия. Готовая среда имеет розовато-желтый цвет. Лактозоположительные штаммы - красного цвета, лактатоотрицательные - бесцветные.

Для выявления сальмонелл проводят посев на среду Эндо и одновременно проводится посев на одну из сред обогащения (Мюллера, Кауфмана, Киллиана). Для этого 20 мл взвеси из мышц и лимфатических узлов вносят в один флакон, а 20 мл взвеси из паренхиматозных

органов - в другой. В каждый флакон наливают по 50 мл среды обогащения.

Среда Кауфмана используется для накопления сальмонелл. В ее состав входят МПБ, мел, раствор Люголя, тиосульфат натрия, стерильная желчь, водный раствор бриллиантового зеленого. В готовом виде среда имеет светло-зеленый цвет и белый осадок.

Среда Киллиана также используется для накопления сальмонелл. В ее состав входит МПБ с водным раствором бриллиантовой зеленой.

Для выявления бактерий рода *Proteus* проводят высеивание в конденсационную воду скошенного МПА по методу Шукевича.

При отсутствии гомогенизатора допускается посев кусочка пробы размером не менее 2,0x1,5x2,5 см путем нанесения отпечатков разными сторонами пробы на поверхность плотных питательных сред. Посев в среды обогащения производят во флаконы, в которые предварительно наливают по 50 мл среды. В один флакон вносят 10 г измельченной пробы из мышц и лимфатических узлов, в другой - 10 г из паренхиматозных органов.

Посевы термостатируют при температуре 37°C в течение 18-24 ч.

Исследование на присутствие анаэробов проводят только в том случае, когда есть подозрение на наличие анаэробной инфекции (эмфизематозный карбункул, злокачественный газовый отек, дизентерия ягнят, энтеротоксемия овец, столбняк, ботулизм). Материалом для исследования являются кусочки пораженных мышц, отечные ткани, лимфатические узлы, печень, селезенка (при эмкаре и злокачественном отеке), содержимое кишечника, пораженная ночка (при дизентерии и энтеротоксемии), раневой секрет, гной (при столбняке), содержимое желудка, толстых кишок, селезенка, печень, головной мозг (при ботулизме).

Навеску материала массой 10 г растирают в стерильной ступке с добавлением 20 мл физиологического раствора. Но 3-5 мл взвеси засевают в четыре пробирки среды Китта-Тароцци (предварительно прогретой в кипящей водяной бане в течение 20-30 мин и охлажденной). Посевы перед термостатированием прогревают; две пробирки при температуре 80°C в течение 20 мин (для всех указанных анаэробов). Остальные оставляют непрогретыми. При исследовании на возбудителя ботулизма в одну пробирку прогревают при температуре 60°C в течение 15

мин, другую -при температуре 80°С в течение 20 мин, остальные две оставляют непрогретыми. Прогревание осуществляют для того, чтобы инактивировать вегетативные клетки сопутствующих факультативных анаэробов. Наблюдение за посевами проводят в течение 5-10 сут.

Среда Китта-Тароцци содержит кусочки предварительно проваренной печени, залитые бульоном, который покрыт слоем вазелинового масла для создания анаэробных условий. Перед использованием среду регенерируют (кипятят с последующим охлаждением).

Тезаурус

Зооантропонозы, МПА, Эндо, чистая культура, смешанная культура, анаэробы, аэробы, факультативные анаэробы, реакция преципитации.

Список литературы

1. Мясо (бактериологический анализ) – ГОСТ 21237-75.
2. Мясо и мясные продукты (обнаружение сальмонелл) – ГОСТ 50455-92.
3. Позняковский В.М. Экспертиза мяса и мясопродуктов. – Новосибирск: Изд. Новосибирский Университет, 2001.
4. Сидоров М.А., Корнелаева Р.П. Микробиология мяса и мясных продуктов. – М.: Колос, 2000.
5. Сидоров М.А., Нецеплов С.В., Корнелаева Р.П. Практикум по микробиологии мяса и мясных продуктов. – М.: Колос, 2000.

Лабораторное занятие № 3 Микрофлора мяса при холодильном хранении, посоле, сушке.

Цель: Ознакомиться с изменениями количественного и группового состава микрофлоры мяса при холодильном хранении, посоле, сушке.

План

1. Микрофлора охлажденного мяса.
2. Микрофлора мороженого мяса.
3. Микрофлора мяса при посоле, сушке в условиях вакуума.

Вопросы для изучения и обсуждения

1. Назовите фазы размножения и состав микрофлоры охлажденного мяса.
2. Какие условия способствуют более интенсивному отмиранию микроорганизмов в замороженном мясе?
3. Перечислите виды порчи мяса и их возбудителей.
4. Что оказывает консервирующее действие на мясо при посоле и сушке?

Задания

Общие:

1. Изучить методики, необходимые для проведения микробиологического исследования мяса при разных способах хранения и консервирования.

Индивидуальные:

1. Для бактериологического исследования на двух студентов выдают по одной пробе охлажденного, замороженного, соленого и высушенного мяса, которые исследуют микробиологически на наличие микроорганизмов.
 2. Ответить на вопросы тест-контроля.

Бактериологическое исследование мяса на наличие анаэробов

1. Для обнаружения анаэробов делают высев:
 - а) на среду Эндо;
 - б) на висмут-сульфитный агар;
 - в) на среду Китта-Тароцци.
2. Для идентификации токсина возбудителя ботулизма:
 - а) ставят РН на белых мышах;

- б) ставят РА;
- в) ставят РНГА с типоспецифическими сыворотками.

3. Возбудитель ботулизма на глюкозо-кровяном агаре:

- а) образует колонии неправильной формы, окруженной зоной гемолиза;
- б) образует колонии округлой формы без гемолиза;
- в) образует колонии округлой формы с зоной гемолиза.

4. Пищевые токсикозы анаэробной природы вызываются:

- а) *Cl. Tetani*;
- б) *Cl. perfringens*;
- в) *Cl. Oedematiens*.

5. Возбудитель ботулизма:

- а) подвижная крупная палочка с терминально расположенной спорой, напоминающей «теннисную ракетку»;
- б) крупная неподвижная палочка, напоминающая веретено;
- в) неподвижная тонкая палочка с терминально расположенной спорой, напоминающая «барабанную палочку».

6. Консервы, содержащие токсин возбудителя ботулизма:

- а) имеют явные признаки порчи, прогорклый запах;
- б) не имеют признаков порчи;
- в) характерный запах плесени.

7. Для обнаружения анаэробов препарат окрашивают:

- а) по Граму;
- б) по Михину;
- в) по Пешкову.

8. *Cl. Perfringens*:

- а) образует споры;
- б) образует капсулы;
- в) образует споры и капсулы.

9. При хранении в холодильнике токсин возбудителя ботулизма:

- а) разрушается;
- б) накапливается;
- в) не образуется, но и не разрушается.

10. Мясо и продукты, из которых выделен токсин:

- а) используют после варки;
- б) уничтожаются;
- в) обеззараживаются путем просолки и проморозки.

Ответы: 1-в, б; 2-а; 3-а; 4-б; 5-а; 6-а; 7-а; 8-в; 9-в; 10-б.

Краткие теоретические и учебно-методические материалы

В процессе холодильного хранения в зависимости от температурных режимов хранения охлажденного и мороженого мяса происходит неодинаковые изменения количественного и группового состава микрофлоры, размножение которой может вызвать порчу продукта.

Микрофлора мяса, поступающего на хранение в камеры охлаждения, разнообразна по составу и обычно представлена мезофилами, термофилами, и психрофилами, т.е. микроорганизмами, имеющими неодинаковые температурные пределы роста.

К концу охлаждения в глубоких слоях мяса температура должна достигать 0-4 С. Следовательно, на охлажденном мясе в процессе хранения могут развиваться только те микроорганизмы, которые имеют наиболее низкие температурные пределы роста и размножения, т.е. психрофильные.

Термофильные и большинство мезофильных микроорганизмов, которые не развиваются при температурах, близких к 0 С, после охлаждения мяса полностью приостанавливают свою жизнедеятельность, переходя в анабиоз. В процессе последующего хранения продукта эти микроорганизмы постепенно отмирают и, следовательно, их количество уменьшается. Но некоторые патогенные и токсигенные бактерии из группы мезофилов (сальмонеллы, токсигенные стафилококки и др.) длительное время сохраняют жизнеспособность при низких температурах и не отмирают при хранении охлажденного мяса.

Во время замораживания мяса отмирает значительное количество микроорганизмов, содержащихся в охлажденном мясе. Кроме низкой температуры на микроорганизмы губительно действуют высокая концентрация растворенных в продукте веществ и пониженная влажность, создающиеся в результате вымерзания воды, изменения содержащихся

в клетках белков и механическое действие льда, образующегося вне клетки, а при быстром замораживании-и внутри клетки.

Микроорганизмы отмирают как в процессе замораживания мяса, так и в процессе его последующего хранения в замороженном состоянии. Отмирание микроорганизмов во время замораживания находится в прямой зависимости от скорости и степени понижения температуры. Чем ниже температура и выше скорость замораживания, тем больше погибает микроорганизмов.

При одинаковых условиях замораживания скорость отмирания микроорганизмов зависит от видовой и родовой принадлежности, возраста и состояния микробных клеток в момент замораживания.

В процессе хранения мороженого мяса отмирание микроорганизмов, выживших при замораживании, замедляется.

При посоле под влиянием высокой концентрации хлорида натрия, пониженной температуры и антагонистических взаимоотношений микроорганизмов различных видов резко изменяется количественный и групповой состав микрофлоры мяса.

Наиболее существенные изменения обусловлены воздействием хлорида натрия. Он оказывает консервирующее действие, задерживая развитие многих микроорганизмов, что объясняется одновременным действием многих факторов.

Хлорид натрия обладает бактериостатическим действием, в процессе посола наиболее чувствительные к высоким концентрациям хлорида натрия микроорганизмы полностью приостанавливают свое развитие, не размножаются и частично отмирают.

Сушка мяса в условиях вакуума является одним из методов консервирования. При сублимационной сушке мясо в условиях вакуума предварительно быстро замораживают, после этого его сушат-удаляют влагу из продукта при низкой температуре в условиях вакуума. При этом удаляется 75-90% влаги. Оставшуюся часть наиболее прочно связанной воды удаляют во время досушки при положительных температурах продукта.

При герметичном упаковывании высушенные продукты можно хранить в течение нескольких лет в нерегулируемых температурных условиях.

Тезаурус

Сапрофитные микроорганизмы, гнилостные бактерии, актиномицеты, кокковые бактерии, патогенные микроорганизмы, сальмонеллы, прижизненное обсеменение мяса, послеубойное обсеменение, экзогенное и эндогенное обсеменение мяса и органов.

Список литературы

1. Сидоров М.А., Корнелаева Р.П. Микробиология мяса и мясных продуктов. – М.: Колос, 2000.
2. Сидоров М.А., Нецеплов С.В., Корнелаева Р.П. Практикум по микробиологии мяса и мясных продуктов. – М.: Колос, 2000.
3. Позняковский В.М. Экспертиза мяса и мясопродуктов. – Новосибирск: Изд. Новосибирский Университет, 2001.
4. СанПиН 2.3.2.1078-01 Приложение 1. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Мясо и мясопродукты, птица, яйца и продукты их переработки.

Лабораторное занятие № 4 Микробиологическое исследование колбасных изделий и продуктов из мяса

Цель: 1. Ознакомиться со схемой бактериологического исследования колбасных изделий.

2. Ознакомиться с методами отбора образцов колбасных изделий для бактериологического исследования.

План

1. Организация микробиологического исследования колбас и продуктов из мяса.
2. Изучение схемы бактериологического исследования колбасных изделий
3. Ознакомиться с методами отбора образцов колбасных изделий для бактериологического исследования.

4. Проведение посевов из образцов колбасных изделий на питательные среды .

Вопросы для изучения обсуждения

1. В каких случаях проводят бактериологическое исследование колбасных изделий?
3. Как часто проводят бактериологическое исследование колбас и продуктов из мяса?
4. Каким образом готовят мазки-отпечатки?
5. Что включает в себя бактериологическое исследование?

Задания

Общие:

1. Изучить схему бактериологического исследования колбасных изделий.
2. Ознакомиться с правилами отбора проб.

Индивидуальные:

1. Для исследования на двух студентов выдают пробу вареных колбасных изделий. Сделать мазки-отпечатки, окрасить по Граму, промикроскопировать.
2. Взвесить пробу (2г и 25г), провести посев на среду Эндо, скошенный МПА.
3. Ответить на вопросы тест контроля:

Микробиология колбасных изделий. В –1.

1. Исследования колбасных изделий проводят?
 - а) для определения доброкачественности;
 - б) при внедрении новых видов продукции;
 - в) на соответствие ГОСТу и ТУ.
2. При бактериологическом исследовании колбас определяют:
 - а) наличие возбудителя сибирской язвы;
 - б) наличие токсина возбудителя ботулизма;
 - в) наличие бактерий группы кишечной палочки.

3. Определение влаги в колбасах проводят:
 - а) рефрактометрическим методом;
 - б) потенциометрическим методом;
 - в) методом высушивания и взвешивания.
4. Допустимое содержание анаэробов в колбасных изделиях:
 - а) должны отсутствовать в 0,1 г;
 - б) должны отсутствовать в 1 г;
 - в) должны отсутствовать в 25 г.
5. Содержание крахмала в вареных колбасах допускается в количестве:
 - а) не более 2%;
 - б) не более 2-10%;
 - в) не допускается.

Микробиология колбасных изделий В – 2.

1. Проба на редуктазу в доброкачественных колбасных изделиях:
 - а) не проводится;
 - б) положительная;
 - в) отрицательная.
2. Колбасы сомнительной свежести:
 - а) подвергаются технической утилизации;
 - б) перерабатываются на низшие сорта колбас;
 - в) направляются на немедленную реализацию или в сеть общественного питания.
3. Содержание сальмонелл в колбасных изделиях определяют:
 - а) в 0,1 г продукта;
 - б) в 1 г продукта;
 - в) в 25 г продукта.
4. Содержание нитратов в сырокопченых колбасных изделиях допустимо:
 - а) не более 3 мг на 100 г продукта;
 - б) не более 5 мг на 100 г продукта;
 - в) не допустимо.
5. Реакция по Эберу в доброкачественных колбасах:
 - а) не проводится;
 - б) положительная;

в) отрицательная.

Краткие теоретические и учебно-методические материалы

Бактериологическое исследование колбасных изделий и продуктов из мяса проводят в случае обнаружения фактов нарушения санитарного и технологического режимов производства, при использовании сырья пониженного качества, при несоответствии органолептических показателей продукции требованиям стандартов или технических условий, а также периодически для проверки соблюдения санитарно-гигиенического и технологического режимов при производстве продуктов.

Периодические исследования в порядке предупредительного контроля соблюдения санитарного и технологического режимов колбасного производства проводят в следующие сроки: для групп колбас вареных, фаршированных, ливерных, кровяных высшего, первого и второго сортов, мясных хлебов, сосисок и сарделек, зельцев высшего и первого сортов не реже одного раза в 15 дней;

- для групп колбас ливерных, кровяных, зельцев третьего сорта, студней и паштетов не реже одного раза в 5 дней;

- для групп колбас полукопченых, варенокопченых и сырокопченых не реже одного раза в месяц;

- для групп продуктов из свинины, говядины, баранины, мяса птицы и других видов убойных животных:

вареных, запеченых, жареных не реже одного раза в 15 дней; копченых вареных, копченозапеченых, сырокопченых не реже одного раза в месяц.

Пробы для бактериологического исследования отбирают согласно ГОСТ 9792-73 от каждой однородной партии (одного вида, сорта, наименования, выработанных в одной смене и др.).

Для отбора проб используют стерильный инструмент, упаковку и условия, исключающие вторичное обсеменение продукта.

Для бактериологического исследования колбасных изделий отбирают образцы массой 250-300 г. Каждый образец упаковывают отдельно в бумагу, указывают сорт, вид изделия, помещают в водонепроницаемую тару. Вместе с пробами направляют акт отбора, в котором указывают наименование и время изготовления продукта, цель исследования. Хранят их при температуре 46° С не более 4 ч с момента отбора.

Объединенную пробу массой 50 г составляют из точечных проб. При этом колбасные изделия в оболочке и продукты из свинины, баранины и говядины помещают в эмалированный тазик, протирают и стерилизуют их поверхность, смоченным в спирте и подожженным тампоном. Батоны разрезают стерильным скальпелем на две половины, не рассекая оболочку противоположной стороны батона. Пробу отбирают из нескольких участков центральной части и из-под оболочки обеих половинок батона. Для посева вырезают стерильным инструментом кусочки продукта, которые помещают в предварительно взвешенный бюкс и отвешивают на весах навеску массой 20 г (с погрешностью, не превышающей 0,1 г).

Приготовление взвеси. Навеску массой 20 г помещают в стерильную фарфоровую ступку и тщательно растирают фарфоровым пестиком, постепенно приливая стерильный физиологический раствор (в объеме 180 см³) с расчетом получения разведения материала в соотношении 1:10 (в 1 см³ взвеси содержится 0,1 г продукта). Из полученной взвеси проводят высевы на питательные среды.

Исследование колбас начинают с приготовления мазков-отпечатков. С этой целью стерильными ножницами вырезают кусочки фарша, находящегося в поверхностном слое (под оболочкой) и в центре батона. Затем, взяв кусочки пинцетом, делают 23 мазка-отпечатка на предметном стекле, высушивают, фиксируют над пламенем, окрашивают по Граму и микроскопируют.

В свежих вареных колбасных изделиях в мазках-отпечатках, приготовленных из продукта, под оболочкой находят до 20 микробных тел в поле зрения, в глубине единичные клетки. В колбасах подозрительной свежести в поверхностных слоях содержится более 30 бактерий, в глубоких 10-20.

Бактериологическое исследование колбасных изделия включает определение общего количества микробов в 1 г продукта (этот показатель не распространяется на сырокопченые колбасы), выявление бактерий родов *Salmonella*, *Escherichia*, *Proteus*, коагулазоположительных стафилококков и определение сульфитредуцирующих анаэробов

Определение общего количества микробов в 1 г продукта (КОЕ/г или КМАФАнМ)

С этой целью готовят серийные десятикратные разведения из приготовленной взвеси. Для этого в пробирку с 9 см³ стерильной воды вносят 1 см³ взвеси, перемешивают, получают разведение 1:100. Из полученного разведения 1 см³ переносят в следующую пробирку со стерильной водой, перемешивают и получают разведение 1:1000 и т. д. Для каждого разведения берут отдельную стерильную пипетку. Из приготовленных разведений вносят по 1 см содержимого в стерильные чашки Петри и заливают 12-15 см³ расплавленного и охлажденного до 45-46°С МПА, быстро смешивают с питательным агаром, осторожно вращая чашки по поверхности стола. После застывания агара чашки Петри переворачивают вверх дном, помещают в термостат и культивируют при температуре 37°С в течение 48 ч. В чашках вырастают колонии мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, т. е. таким образом, мы определяем их общее количество (КМАФАнМ).

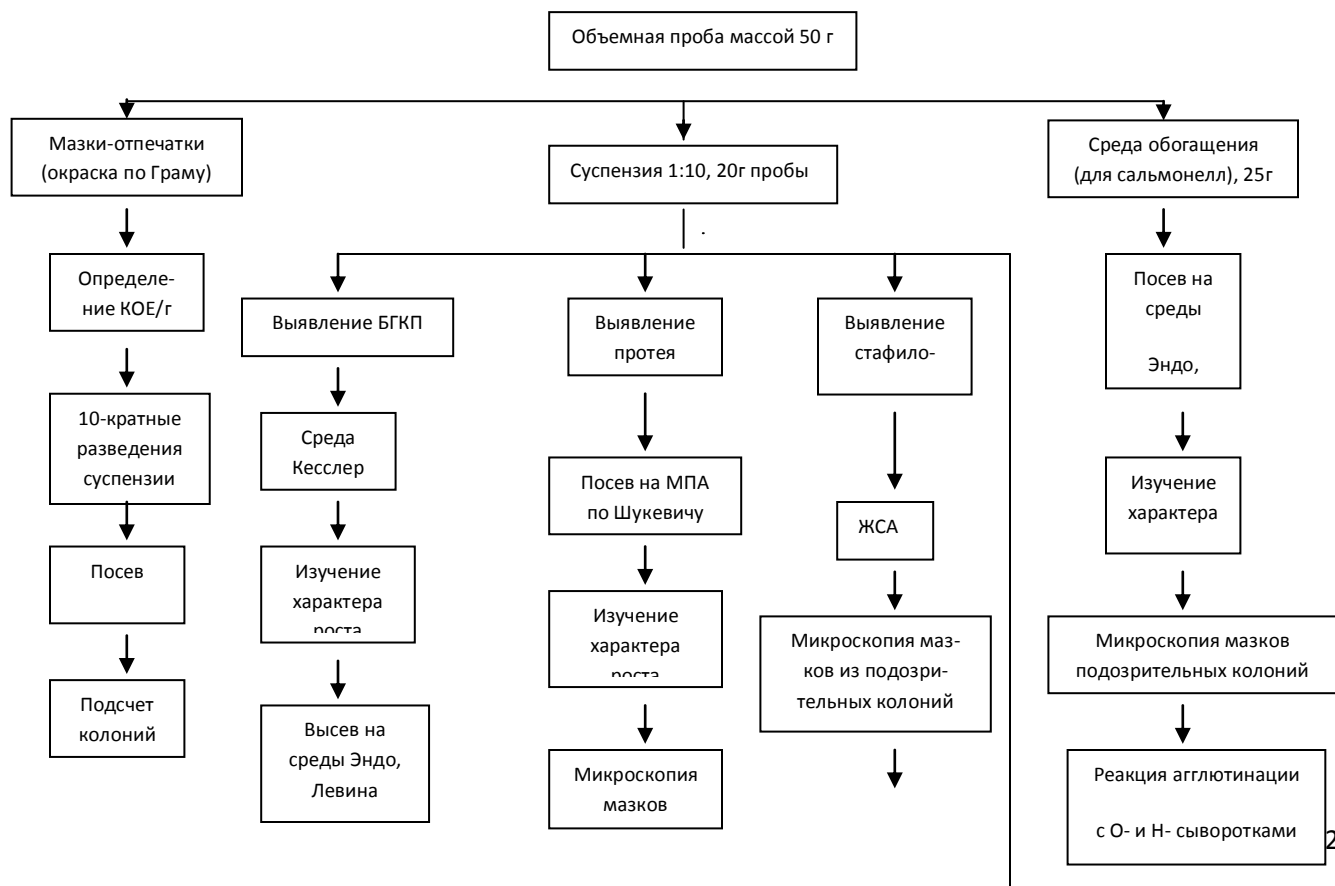
Выявление бактерий группы кишечных палочек

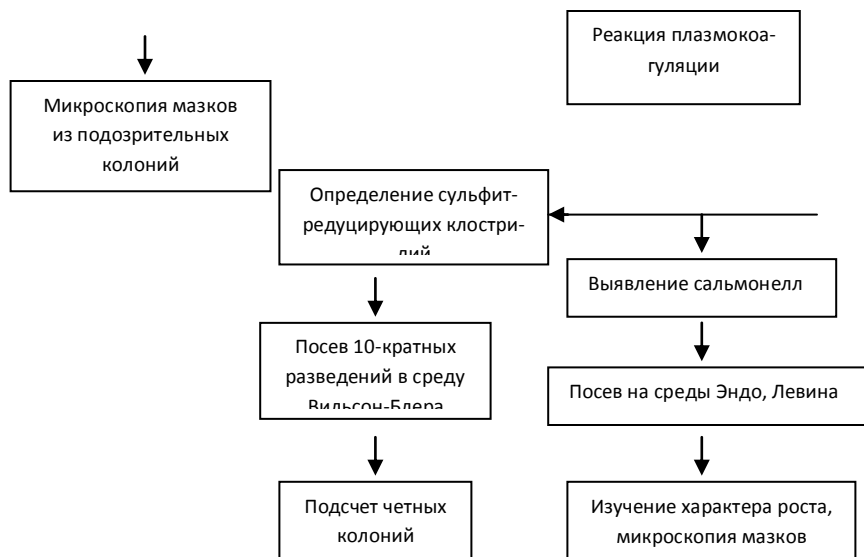
В среду Кесслер или «ХБ» вносят 5 см исследуемой взвеси, помещают в термостат при температуре 37° С на 18-20 ч. При росте бактерий группы кишечных палочек на среде Кесслер в газовке (поплавке) образуется пузырек газа, а среда «ХБ» приобретает желтый цвет.

В состав среды Кесслер входит мясопептонный бульон, глюкоза, желчь крупного рогатого скота, генцианвиолет. Два последние компонента ингибируют развитие посторонних микроорганизмов. В состав среды «ХБ» входит водопроводная вода, пептон, хлористый натрий, маннит, дрожжевой автолизат, желчь крупного рогатого скота, раствор хинозола и раствор бромкрезолпурпура в качестве индикатора. Культу-

ры *E. coli* разлагают маннит, изменяют pH среды, и она приобретает желтый цвет.

Схема бактериологического исследования колбасных изделий





Выявление бактерий рода Salmonella

Навеску продукта массой 25 г объединенной пробы вносят во флакон, содержащий 100 см среды обогащения (Кауфмана, Киллиана, селенитовая, магниевая «М») и помещают в термостат для культивирования при температуре 37°C. Через 16-24 ч проводят учет результатов посева. Одновременно делают посев из взвеси на среду Эндо, распределяя материал шпателем по поверхности.

Среда Кауфмана содержит МПБ, мел, раствор Люголя, тиосульфат натрия, стерильную желчь и водный раствор бриллиантового зеленого, Среда имеет зеленоватый цвет и белый осадок мела.

Среда Киллиана содержит МПБ и водный раствор бриллиантового зеленого. Имеет зеленый цвет.

Эти среды задерживают рост молочнокислых бактерий и кокков, но способствуют росту сальмонелл.

Выявление бактерий рода Proteus

Для выявления наличия протей 0,1 см³ исследуемой взвеси вносят в конденсационную воду свежескошенного МПА, не касаясь поверхности среды (метод Шукевича). Вертикально поставленные пробирки помещают в термостат и культивируют при 37° С в течение 18-24 ч.

Выявление коагулазоположительных стафилококков

Из исследуемой взвеси проводят посев по методу Дригальского на желточно-солевой агар (ЖСА), содержащий 6,5 % хлористого натрия, для выявления солеустойчивых стафилококков и определения их лецитиназной активности. Посевы термостатируют при 37°C в течение 24 ч. Стафилококки выявляют также на молочно-солевом агаре (МСА).

Определение сульфитредуцирующих клостридий

В пробирки, содержащие 9 см³ расплавленной до 45°C среды Вильсон-Блера, вносят по 1 см³ десятикратных разведений взвеси испытуемого продукта (от 10⁻¹ до 10⁻⁷). Тщательно перемешивают посевной материал, помещают пробирки в термостат и культивируют при 37 С в течение 20 ч.

Среда Вильсон-Блера содержит МПА, глюкозу, 20 %-ный раствор сернистокислого натрия, 8 %-ный раствор хлористого железа, При восстановлении сернистокислого натрия образуется

сульфат натрия, который соединяется с хлористым железом и образует черный осадок сульфида железа, окрашивающий колонии. *Clostridium perfringens* обладает большой скоростью роста и вызывает почернение среды через 1-2 ч.

Тезаурус

Охлажденное мясо, подмороженное мясо, замороженное мясо, фарш, осадок фарша, обжарка, варка фарша, сырокопченые колбасы.

Список литературы

1. Сидоров М.А., Корнелаева Р.П. Микробиология мяса и мясных продуктов. – М.: Колос, 2000.

2. Сидоров М.А., Нецеплов С.В., Корнелаева Р.П. Практикум по микробиологии мяса и мясных продуктов. – М.: Колос, 2000.

3. Позняковский В.М. Экспертиза мяса и мясопродуктов. – Новосибирск: Изд. Новосибирский Университет, 2001.

4. СанПиН 2.3.2.1078-01 Приложение 1. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Мясо и мясопродукты, птица, яйца и продукты их переработки.

Лабораторное занятие № 5 Микроскопическое исследование молока

Цель: Ознакомиться с методикой микроскопического исследования молока.

План

1. Микроорганизмы, используемые при производстве молочных продуктов.
2. Микрофлора молока.
3. Окраска мазков анилиновыми красителями и микроскопия.

Вопросы для обсуждения и изучения

1. Какие микроорганизмы, используемые при производстве молочных продуктов, относятся к основным группам?
2. Что представляют собой молочнокислые, пропионово-кислые бактерии, лактобактерии, бифидобактерии и уксуснокислые бактерии?

Задания

Общие:

1. Записать в рабочую тетрадь систематику, морфологию, культуральные, биохимические свойства молочнокислых, пропионовокислых, уксуснокислых бактерий, лактобактерий, бифидобактерий.

Индивидуальные:

1. Приготовить мазки из молока.
2. Окрасить мазки анилиновыми красителями.
3. Рассмотреть под микроскопом и зарисовать в рабочую тетрадь.

Краткие теоретические и учебно-методические материалы

Микроскопическое исследование молока. Морфологию жировых шариков определяют в капле разведенного молока. Для этого 5 мл молока разбавляют 20 мл дистиллированной воды. Каплю разбавленного молока с помощью стеклянной палочки наносят на предметное стекло, покрывают покровным стеклышком и рассматривают под микроскопом при увеличении в 300—500 раз. Для определения диаметра жировых шариков используют окуляр-микrometer. Жировые шарики имеют диаметр в среднем 3—4 мкм с колебаниями от десятых долей микрона до 10 мкм. Жировые шарики в нормальном молоке имеют вид круга или легкого овала.

Всякая деформация шариков указывает на порочность молока. На величину жировых шариков влияют различные факторы (порода, условия содержания и кормления, состояние здоровья животного, период лактации и др.) Преобладание жировых шариков с

малым диаметром наблюдается в молоке коров стародойных. Наличие жировых шариков с большим диаметром (до 1020 мкм) может быть сигналом заболевания коровы, Имеются исследования, свидетельствующие о том, что жировые шарики молока увеличиваются при заболевании коров с повышением температуры тела,

Преобладание жировых шариков с большим диаметром наблюдается и в молоке коровы в молозивный период. Иногда в препарате наблюдается агглютинация жировых шариков. Это явление можно видеть в молоке в последние дни молозивного периода, при повышенной кислотности молока. Мы наблюдали агглютинацию жировых шариков в препаратах молока коров с наличием хронической (скрытой) формы воспалительного процесса в молочной железе.

Количество лейкоцитов в молоке может служить ориентиром при подозрении на воспалительный процесс в молочной железе. Для определения содержания их наливают в специальные центрифужные пробирки 10 мл профильтрованного через вату молока и центрифугируют в течение 5 мин при 1200 об/мин. В осадке на дне пробирки будут сконцентрированы белки молока, лейкоциты, а также микроорганизмы частицы механической примеси и др. Из осадка платиновой петлей делают на предметном стекле тонки мазок, подсушивают его на воздухе, погружают для фиксации в ксилол и окрашивают.

Мазки красят одним из следующих способов: а) по Романовскому—Гимза; б) раствором метиленового синего (1 мл насыщенного спиртового раствора краски, растворенной в 30 мл дистиллированной воды); в) краски Ньюмена (1 г метиленового синего, 54 мл этилового спирта крепостью 90% 6 мл уксусной кислоты и 40 мл тетрахлорэтана). Краской Ньюмена мазки окрашивают в течение 30 минут.

Окраска по Романовскому—Гимза, раствором метиленового синего, а также краской Ньюмена хорошо выявляют лейкоциты, стрептококки и стафилококки. Увеличенное количество в мазке лейкоцитов и вместе с этим наличие стрептококков и других кокковых форм микроорганизмов вызывает подозрение на мастит. Однако только на этом основании ставить диагноз на мастит нель-

зя, поскольку увеличение клеток можно наблюдать и в молозиве, и в молоке стародойных коров, а также в период течи и при легких раздражениях молочной железы.

Микроскопию мазков из осадка проводят в тех случаях, когда при центрифугировании пробы молока образуется значительный осадок. Центрифужные пробирки имеют деления с цифрами. Осадок, полученный при центрифугировании проб молока здоровых коров, обычно имеет желтоватый цвет. Осадок, достигающий отметки 1 и превышающий ее, вызывает подозрение на заболевание молочной железы, что является показателем необходимости микроскопического исследования осадка

Наличие рostrальных клеток в пробах молока устанавливают также микроскопически, что является ценным показателем санитарно-гигиенических и технологических свойств молока. Значительное количество этих клеток в пробе свидетельствует о примеси в молоке молозива.

Глоссарий

1. Актиномицеты – лучистые грибы, имеющие одноклеточный несептированный мицелий. Отсутствуют у них ядро и органы плодоношения. Размножаются спорами и поперечным делением пополам.

2. Анаэробы – микроорганизмы, которые могут осуществлять обмен веществ и размножаться в условиях отсутствия кислорода в среде обитания.

3. Антагонизм микробный – угнетение роста одного микроба другим.

4. Антибиотики – вещества микробного происхождения, обладающие способностью задерживать развитие и вызывать гибель различных микроорганизмов и вызывать гибель различных микроорганизмов, главным образом, бактерий.

5. Антибиотикоустойчивые формы бактерий – штаммы бактерий, обладающие устойчивостью к терапевтическим концентрациям данного антибиотикоустойчивого препарата, к которым они ранее были чувствительны.

6. Аэробы – микроорганизмы, использующие атмосферный кислород в качестве конечного акцептора электронов при биологическом окислении.

7. Бактерии – одноклеточные организмы, характеризующиеся разнообразной формой и довольно сложной структурой, отвечающей многообразию их функциональной деятельности.

8. Бактериологические методы – это методы лабораторной диагностики бактериальных инфекций, основанные на выделении чистых культур возбудителей путем посева патологического материала на питательные среды и последующей идентификации этих культур.

9. Бациллы – палочковидные, грамположительные анаэробные микробы, образующие при неблагоприятных условиях (вне организма) споры.

10. Анилиновые красители – продукт перегонки, каменноугольных смол, мелкие кристаллические порошки разных оттенков.

11. Кокки – бактерии сферической формы, которые в зависимости от плоскостей деления и расположения в препарате могут делиться на несколько групп.

12. Термофильные молочнокислые бактерии – бактерии, развивающиеся при $T = 40-45^{\circ}\text{C}$. При сбраживании сахаров образуют до 3,5% молочной кислоты. Молоко свертывают в течение 6-12 ч.

13. Мезофильные молочнокислые бактерии развиваются при температуре 30°C и располагаются цепочкой, они образуют меньше продуктов жизнедеятельности, кислотность продукта не превышает 180°C .

14. Гетероферментативные молочнокислые бактерии встречаются на растениях, сбраживают сахара с образованием большого количества спирта и углекислого газа.

15. Брожение – анаэробный окислительно-восстановительный процесс, вызываемый как живыми клетками микроорганизмов, так и выделяемыми ими ферментами.

16. Молочнокислые стрептококки – типичный представитель молочнокислого брожения, находится почти во всех молочных продуктах.

17. Ацидофильная палочка – постоянный обитатель желудочно-кишечного тракта молодняка с/х-ных животных, откуда она и выделяется.

18. Пропионовокислое брожение – сходно с молочнокислым брожением. Вызываются пропионово-кислыми бактериями, которые находятся в молоке, молочных продуктах и почве. Они легко сбраживают молоко. Широко используют в сыроделии

19. Маслянокислое брожение – образуется масляная кислота – летучая жидкость с неприятным запахом. Возбудители его являются фиксаторами атмосферного азота.

Список литературы

1. Асонов Н.Р. Микробиология. – М.: Колос, 2001.
2. Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов. Санитарные требования и нормы СанПиН 2.3.2.562-96. - М., 1997.
3. Молоко и молочные продукты (микробиологический анализ) ГОСТ 9225-84.
4. Степаненко П.П. Микробиология молока и молочных продуктов. – М., 2002.

Лабораторное занятие № 6 Микробиологический анализ молока. Отбор проб и подготовка к исследованию. Определение коли-титра в молоке.

Цель: 1. Ознакомиться с правилами отбора проб молока для микробиологического исследования, определить численность микроорганизмов в молоке, титр кишечной палочки.

План

1. Схема отбора проб молока.
2. Определение общего количества микробов.

3. Определение коли-титра в молоке.
4. Редуктазная проба.

Вопросы для обсуждения и изучения

1. Микрофлора молока.
2. Возбудители порчи молока.
3. Понятие о пищевых инфекциях.
4. Механизм развития пищевых инфекций.

Задания

Общие:

1. Отобрать пробу молока для исследования.
2. Зарисовать таблицу: «Классификация молока по редуктазной пробе с резазурином»

Индивидуальные (рабочие места на 2 человека):

1. Поставить пробу на редуктазу.
2. Определить общее количество бактерий в молоке.
3. Определить титр кишечной палочки.
4. Дать заключение о качестве образцов молока.

Краткие теоретические и учебно-методические материалы

Микробиологический анализ молока. Отбор проб и подготовка к исследованию.

Для микробиологического исследования берут лабораторный образец. Посуду с образцом закрывают стерильной ватной или стеклянной притертой пробкой. На этикетке указывают номер пробы, название продукта, номер и размер партии продукта, день и час отбора пробы. На этикетке Должна быть подпись лица, взявшего пробу, с указанием его должности.

Если образец отправляют в лабораторию, находящуюся за пределами предприятия (мясо-молочной и пищевой контрольной станции), ее пломбируют или опечатывают. На этикетке пробы должно быть указано наименование предприятия, изготовившего данный продукт, или владельца данного продукта. Исследуют про-

бу не позднее 4 ч с момента ее взятия. В исключительных случаях допускается хранение пробы в течение 12 ч, но при этом составляется акт с указанием продолжительности срока хранения и причины задержки исследования. Образцы сохраняют до начала исследования в условиях, обеспечивающих температуру продукта не выше 6°C, и, не допуская подмораживания.

Среднюю пробу молока получают следующим образом: молоко перемешивают стерильным черпаком, берут в стерильную колбу 50 мл; закрывают колбу стерильной пробкой и отмечают температуру молока. От молока в расфасовке (бутылках) берут пробу в ее упаковке в количестве 1—2 образцов. Взятые пробы должны быть охлаждены до 6°C.

Определение общего количества микробов. Исследования сводятся к установлению количества микроорганизмов в 1 мл молока.

Чашечный метод (стандартный). Из образца пастеризованного молока получают разведения в стерильной воде 1:10; 1:100; 1:1000; сырого - 1:10000; 1:100 000; 1:1000 000. Если предполагается интенсивная обсемененность молока, разведения могут быть взяты еще большей кратности. В бактериологические чашки засевают по 1 мл от каждого разведения молока и заливают 12—15 мл расплавленного и остуженного до 45°C питательного агара (мясопептонный агар). Засеянные чашки помещают на двое суток в термостат при температуре 37°C, после чего подсчитывают колонии в каждой чашке, используя лупу с увеличением в 8-10 раз.

Дно чашки расчерчивают на 4 и более секторов и подсчитывают количество колоний в 2-3 секторах, если они охватывают не менее одной трети чашки. Затем выводят среднее арифметическое для этих секторов и умножают на количество расчерченных секторов. Число колоний каждой чашки умножают на степень разведения молока. Так поступают в отношении каждой засеянной чашки. Сумму колоний во всех чашках делят на количество чашек и таким образом устанавливают показатель микробного обсеменения 1 мл молока.

Молоко считают нормальным, если в наименьшем разведении находят не менее 50 колоний, а в наибольшем - не более 300.

Способ счета по Фросту является менее трудоемким методом и состоит в следующем: 0,1 мл молока (разведенного) с каплей питательного агара быстро и равномерно распределяют на стерильном предметном стекле, площадь которого должна быть равна 1 см². Затем предметное стекло помещают во влажную камеру и держат в термостате при температуре 30°С в течение 8-10 часов.

Количество колоний, обнаруженных под микроскопом на площади мазка, умноженное на 10, будет показывать число колоний в 1 мл разведенного молока. Этот метод иногда называют "методом микропластинок".

Подсчет микробов по Бриду является еще более доступным методом для практической экспертизы молока. Его используют в тех случаях, когда подозревают значительную бактериальную обсемененность продукта.

0,01 мл разведенного молока распределяют равномерно на участке предметного стекла площадью 1 см². Мазок высушивают на воздухе, фиксируют спиртом и окрашивают метиленовым синим. После этого под микроскопом с иммерсионной системой подсчитывают общее количество микроорганизмов в мазке. Количество микробов, обнаруженных на всей площади мазка, умноженное на 100, и кратность раз. Ведения будут соответствовать количеству их в 1 мл разведенного молока.

Молоко пастеризованное бутылочное и в пакетах группы А должно иметь в 1 мл не более 75 000 бактерий, пастеризованное группы Б — не более 150 000 и пастеризованное во флягах и цистернах — не более 300 000 микроорганизмов.

Сырое молоко по степени бактериальной обсемененности еще до сих пор не регламентировано.

Определение коли-титра в молоке. Титром кишечной палочки (бродильным титром) называют наименьшее количество молока, выраженное в миллилитрах или граммах, в котором устанавливается наличие бактерий из группы кишечной палочки.

Типичной кишечной палочкой признается микроорганизм: подвижный (хотя бы и слабо), грамнегативный, морфологически соответствующий *E. coli*, сбразивающий глюкозу с образованием газа и кислоты.

Коли-титр характеризует санитарно-гигиенический режим получения и обработки молока и условия содержания коров.

В соответствии с Государственным стандартом 9225—68 при анализе пастеризованного молока делают высеv в шесть пробирок со средой для культивирования: в три пробирки по 1 мл, в три — по 0,1 мл молока от каждого разведения.

Для посева при определении коли-титра используют среду Кесслера. В пробирки с этой средой вносят по 1 мл разведенного молока и после осторожного перемешивания (избегать образования пузырьков газа) ставят их в термостат при температуре 43°С на 18—48 ч. О наличии кишечной палочки свидетельствует образование газа. Отсутствие газообразования через 48 ч является показателем того, что молоко не содержит кишечной палочки.

Из пробирок со средой Кесслера, в которых было обнаружено газообразование, необходимо сделать посев на среду Эндо. Дно чашки делят на четыре сектора и из каждой пробирки производят посев в отдельный сектор. Посевы в чашках (крышками вниз) выдерживают в термостате при температуре 37°С в течение 18—24 ч, после чего получают вырос колонии. Отсутствие красных, нередко с металлическим отблеском или без него, розовых, бледно розовых колоний является указанием на то, что исследуемое молоко свободно от кишечной палочки.

При наличии колоний, типичных для кишечной палочки, а также колоний бесцветных выделяют чистые культуры и проводят бактериоскопическое исследование окрашенных препаратов. Для этого из подозрительных колоний делают посев в пробирки с мясо-пептонным бульоном, выдерживают посевы в термостате при температуре 37°С в течение 2,5—3 ч, затем готовят препараты, окрашивают по Граму и устанавливают чистоту культуры, морфологию микроорганизма и отношение его к окраске по Граму. Бактерии группы кишечной палочки по Граму не красятся — они будут красного цвета.

Из полученной чистой культуры делают посев на среду Козера и среду с глюкозой. Засеянные пробирки со средой Козера необходимо выдерживать в термостате при 37°С, а с глюкозой — при 43°С в течение 18—24 ч. Посев производят пипеткой емкостью 1

мл путем введения в пробирку со средой трех капель выделенной культуры.

Если бактерий кишечной палочки нет, то среда с глюкозой не изменится. Появление кислоты и газа в среде с глюкозой и отсутствие роста на среде Козера будут указывать на наличие бактерий группы кишечной палочки.

Изменение цвета среды Козера (из оливково-зеленого в васильковый) свидетельствует о наличии бактерий, принадлежащих к группе кишечной палочки, но таких, которые не учитываются при определении коли-титра.

Стандарт (ГОСТ 9225—68) предусматривает при установлении коли-титра пастеризованного молока учитывать результаты следующим образом:

- если ни в одной из пробирок кишечной палочки не обнаружено, то титр считают "более 3 мл";
- если в одной из трех пробирок с 1 мл продукта выявлена, кишечная палочка, то титр принимают за "3 мл";
- если кишечная палочка отмечена в посевах в пяти или во всех объемах продукта, то титр "менее 0,3 мл";
- во всех остальных случаях коли-титр будет "0,3 мл".

Коли-титр для пастеризованного молока бутылочного и в пакетах группы А допускается "3 мл"; в пакетах группы Б — "0,3 мл"; во флягах и цистернах — "0,3 мл". Для сырого молока, продаваемого на рынках строго установленного титра кишечной палочки нет, поэтому купленное молоко перед употреблением не обходимо кипятить.

Определение коли-титра с помощью индикаторной бумаги. Метод разработан Всесоюзным научно-исследовательским молочным институтом (ВНИМИ). В качестве индикатора при приготовлении индикаторных бумаг используется трифенилтетразолиум хлористый, который под влиянием ферментов микроорганизмов восстанавливается до формазана, имеющего красный цвет. Кишечная палочка, находящаяся в молоке, хорошо развивается (в отличие от других микроорганизмов) в питательной среде с 0,2% трифенилтетразолиума хлористого; на этом основано определение кишечной палочки в молоке.

Готовят бумагу по В. М. Богданову и др. Для этого берут хроматографическую бумагу массой 200 г/м^2 , имеющую впитываемость по Клемму около 50 и состав по волокну 100% тряпичной полумассы. Листы разрезают на полоски перфорируют. Бумагу стерилизуют при 105°C (в сушильном шкафу) с выдержкой 30 мин.

Затем бумагу пропитывают стерильной питательной средой, состоящей из мясного бульона с 5% гидролизованного молока, 0,5% лактозы и 0,1% агара (рН среды 7,2—7,5) с добавлением 2%-ного водного раствора 2,3,5-трифенилтетразолиума хлористого (из расчета 110 мл на 1 л среды). Бумагу высушивают в течение 14—16 ч в сушильном шкафу при 40°C . Подготовленные таким образом листы разрезают на полоски, каждая из которых впитывает 1 или 0,5 мл жидкости. Цвет бумажек белый или слегка кремоватый.

Индикаторные бумаги чрезвычайно чувствительны к свету, поэтому их необходимо держать в полиэтиленовых пакетах, вложенных в пакеты из черной бумаги. Вынимают бумаги из пакетов непосредственно перед использованием.

Пастеризованное молоко можно исследовать в неразведенном виде или после разведения физиологическим раствором 1:10, сырое - только в разведенном состоянии 9 от 1:100 до 1:10000).

Полиэтиленовый пакетик с индикаторной бумагой разрезают с той стороны, где имеется перфорация, извлекают бумагу и смачивают в исследуемой жидкости погружая на 3с. Излишек жидкости удаляют прикосновением кончика бумаги к стенке сосуда. Бумага впитывает 1 или 0,5 мл исследуемой жидкости (молока). После этого бумагу опять помещают в полиэтиленовый пакетик и перфорированный конец удаляют. Чтобы удалить воздух из пакетика и чтобы пленка плотно прилегала к смоченной бумаге, пакетик хорошо разглаживают и разрезанный конец запаивают. Таким образом подготовленный пакетик вкладывают в пакет из черной бумаги и помещают в термостат при температуре $42\text{—}43^\circ\text{C}$ на 12 ч (не больше). Чтобы жидкость не стекала с бумаги, последняя должна находиться в строго горизонтальном положении.

Если имеются бактерии из группы кишечной палочки, то на индикаторной бумаге появятся различного размера красные пятнышки. Количество красных пятнышек на обеих сторонах бумаги

умножают (если бумага впитала 1 мл молока) на разведение исследуемого молока и получают количество микробных клеток в 1 мл молока. Если бумага впитала 0,5 мл молока, то количество микробов удваивают.

Ввиду того, что индикаторная бумага улавливает всех представителей группы кишечной палочки, следует сделать высев в среду Симонса и тем самым исключить *V. aerogenes*.

Приготовление сред и реактивов. Среда Кесслера (модифицированный состав):

Питьевая вода	1 л
Пептон	
10 г	
Желчь сельскохозяйственных животных свежая	50 мл
Глюкоза	
2,5 г	
Генцианвиолет (1%ный водный раствор)	2 мл

В воду вносят пептон и желчь и кипятят в водяной бане при помешивании 20—30 мин. После фильтрования (через вату) в фильтрате растворяют глюкозу и доводят объем водой до 1 л. Определяют рН среды, которая должна быть равной 7,4—7,6, добавляют генцианвиолет и разливают в пробирки с поплавками. Среду в пробирках стерилизуют под давлением 7 атм. в течение 10 мин. Среда должна быть темно-фиолетового цвета.

Среда Эндо: к 100 мл готового мясопептонного агара (рН 7,6—7,8) добавляют (соблюдая стерильность) 1 г химически чистой лактозы, растворенной в 5 мл стерильной воды и подогретой на водяной бане при 100°C в течение 5 мин; в отдельную пробирку наливают 0,5 мл профильтрованного 10%ного спиртового раствора основного фуксина, к которому добавляют свежеприготовленный 10%ный водный раствор сернокислого натрия ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) до образования бледно-розового окрашивания. Полученную смесь выливают в расплавленный лактозный агар и разливают в чашки Петри. При добавлении смеси в расплавленный лактозный агар не допускают вспенивания. Среда Эндо всегда должна быть свежеприготовленной.

Среда с глюкозой. К 1 л дистиллированной воды добавляют 10 г пептона, 2,5 г глюкозы, несколько капель индикатора Андресэ и доводят рН до 7,2—7,4. Затем смесь разливают в пробирки с поплавками и стерилизуют трижды в аппарате Коха при 100°С. в течение трех дней, по 20 мин ежедневно. Стерилизовать можно также в автоклаве под давлением 1 атм в течение 15 мин.

Состав индикатора Андресэ: кислый фуксин 1 г, нормальный раствор едкого натра 32 мл и дистиллированную воду 200 мл смешивают и настаивают 3 дня при комнатной температуре или в течение суток при температуре 37°С и фильтруют.

Среда Козера (модифицированная): 1,5 г фосфорнокислого натрийаммония, 1 г фосфорнокислого однозамещенного калия, 0,2 г сернокислого магния и 2,5—3 г лимоннокислого натрия растворяют в 1 л дистиллированной воды. Раствор стерилизуют в автоклаве под давлением 1 атм. в течение 15 мин. В еще не застывшую среду прибавляют 10 мл 0,5%ного спиртового раствора бромтимолового синего, затем среду разливают в стерильные пробирки.

Гидролизованное молоко готовят из обычного или восстановленного обезжиренного молока, разбавленного водой (1 часть молока, 2 части воды), стерилизованного при 1 атм. с выдержкой в 15 мин. (можно кипятить). Эта среда должна иметь рН 7,6—7,8. К 1 л молока, подогретого до 45°С, прибавляют 1 г сухого панкреатина в порошке, предварительно разведенного в небольшом количестве теплой воды. Разрешается вместо панкреатина порошкового прибавлять 5 г поджелудочной железы, Измельченной в мясорубке.

После добавления 5 мл хлороформа колбу закрывают пробкой и выдерживают в термостате 72 ч. При 40°С. Рекомендуется в первые часы несколько раз перемешать содержимое колбы и после перемешивания каждый раз открывать пробку для удаления паров хлороформа. После выдержки в термостате гидролизат фильтруют через бумажный фильтр, устанавливают рН 7,2—7,4 и гидролизат стерилизуют при 1 атм. в течение 15 мин.

Чтобы приготовить агар из гидролизованного молока, добавляют к нему 1,5% агара. Агар предварительно измельчают, промывают в проточной воде, затем его расплавляют при 1 атм. в течение 15 мин. и после фильтрования через вату разливают в пробирки

или колбы и стерилизуют при 1 атм. 10 мин. Фильтруют расплавленный агар в теплом автоклаве.

Реактивы для окраски по Граму (модификация Г. П. Калины). Реактив 1. В 100 мл этилового спирта растворяют 0,5 мл кристаллического фиолетового.

Реактив 2. К 96 мл 0,5%-ного спиртового раствора йодистого калия добавляют 2 мл 5%-ного спиртового раствора основного фуксина и 2 мл 5%-ного спиртового раствора йода.

Примечание. Растворение калия йодида в спирте рекомендуется проводить в водяной бане 45—50°C при постоянном помешивании.

Глоссарий

1. Пищевые токсикозы (интоксикации) – вызваны употреблением в пищу продуктов, содержащих в большом количестве токсины, которые накопились в результате жизнедеятельности определенных видов микроорганизмов.
2. Токсикоинфекция – развивается только после употребления пищевых продуктов, содержащих живые микроорганизмы в большом количестве. Они развиваются в результате попадания возбудителей от больных людей, животных или бактерионосителей в пищевые продукты, в которых происходит их размножение.
3. Сапрофиты – гетеротрофные микроорганизмы, для которых источниками питания служат «неживые» органические субстраты: трупы животных, погибшие растения, продукты обмена различных организмов.
4. Микробное число – общее количество микроорганизмов, содержащихся в единице объема или массы (1 мл воды, 1 мл молока, 1 г почвы, 1 м³ воздуха).
5. Коли-индекс - количество особей кишечной палочки, содержащихся в соответствующем количестве среды.
6. Раствор резазурина – с помощью этого реактива определяют число микробов в 1 мл молока, ни и количество лейкоцитов в молоке.
7. Коли-титр – величина, выражающая наименьшее количество исследуемого материала в 1мл, в котором обнаружена одна кишечная палочка. Определяют по среде Кесслера, в состав кото-

рой входят вещества (желчь, краска генцианвиолет), подавляющие рост молочнокислых и других грамположительных микроорганизмов

Список литературы

1. Асонов Н.Р. Микробиология. – М.: Колос, 2001.
2. Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов. Санитарные требования и нормы СанПиН 2.3.2.562-96. - М., 1997.
3. Молоко и молочные продукты (микробиологический анализ) ГОСТ 9225-84
4. Степаненко П.П. Микробиология молока и молочных продуктов. – М., 2002.

Лабораторное занятие № 7 Определение патогенных микроорганизмов в молоке

Цель: Ознакомиться с основными патогенными микроорганизмами, встречающимися в молоке.

План

1. Патогенные микроорганизмы, встречающиеся в молоке и молочных продуктах.
2. Возбудители кишечных инфекций человека.
3. Возбудители зооантропонозов.

Вопросы для обсуждения и изучения

1. Что представляют собой патогенные стафилококки, стрептококки, их отличие.
2. Почему возбудитель ботулизма относят к числу самых тяжелых заболеваний?
3. Что такое ядовитые метаболиты?
4. Почему бактерии рода *Salmonella* занимает первое место среди микробных пищевых отравлений.
5. Основные и опасные болезни, которые могут передаваться с молоком и молочными продуктами.

Задания

Общие:

1. Каждый студент готовит мазки для обнаружения:
 - а) микобактерий туберкулеза;
 - б) возбудителя бруцеллеза;
 - в) стафилококков;
 - г) сальмонелл;
 - д) мастита;
2. Ответить на тест-контроль (см. приложение).

Индивидуальные:

1. Окрасить мазки разными способами:
 - а) по Граму;
 - б) по Циль-Нильсену.
2. Рассмотреть под микроскопом и зарисовать.
3. Дать санитарную оценку молока по каждому заболеванию.

Краткие теоретические и учебно-методические материалы

Определение патогенных микроорганизмов в молоке. Наиболее важным моментом в практике санитарной оценки молока является установление в нем возбудителей токсикоинфекций, токсикозов, антропозоонозных и других заболеваний, передающихся через молоко.

Для этого существует система бактериологического исследования, включающая биопробы на лабораторных животных, которая описывается в специальных руководствах по бактериологии. В данном разделе приведены лишь те методы, которые являются наиболее портативными и сравнительно легко выполнимыми в условиях работы практического ветеринарно-санитарного эксперта.

Обнаружение микобактерий туберкулеза. Первый способ. 25 мл исследуемого молока смешивают с 2 мл аммиака, 50 мл петролейного эфира и 50 мл серного эфира. Смесь тщательно взбалтывают, отстаивают, после чего нижний слой отсасывают в отдельную пробирку и центрифугируют. Мазок, полученный из осадка, окрашивают одним из принятых методов и изучают под микроскопом.

Второй способ. 5 мл исследуемого молока смешивают с 5 мл спирта, 10 мл антимоρφина и 25 мл физиологического раствора и смесь центрифугируют. Полученный из осадка мазок окрашивают и также изучают под микроскопом.

Метод Циля—Нильсена — наиболее употребительный для окраски возбудителя туберкулеза. Препарат, зафиксированный над пламенем горелки, окрашивают раствором карболфуксина в течение 1—2 мин с подогреванием до появления паров. Затем краску смывают водой и обесцвечивают мазок 5%-ной серной кислотой до появления желтого оттенка, что наблюдается примерно через 5—10 с. Препарат промывают водой, прополаскивают в спирте и вновь промывают водой, после чего дополнительно окрашивают метиленовой синью Леффлера, промывают водой и высушивают. Возбудитель туберкулеза окрашивается в красный цвет (фон препарата синий).

Метод флотации (по М. М. Дрябиной) заключается в следующем: к 50 мл молока, находящегося в бутылочке, прибавляют 50 мл 5%-ного едкого кали. После перемешивания содержимого бутылочку помещают на 30 мин в водяную баню при температуре 56—60°C. Затем добавляют 0,5—1 мл ксилола и 60—80 мл дистиллированной воды, закрывают бутылочку резиновой пробкой и встряхивают в течение 10 мин. Подготовленную таким образом пробу молока переливают в узкогорлую колбочку и оставляют в покое на 45—60 мин при комнатной температуре.

Сущность метода заключается в адсорбировании ксилолом возбудителя туберкулеза; при отстаивании пробы ксилол всплывает на поверхность в виде кольца в узкой колбочке.

Отсюда этот слой можно легко перенести на предметное стекло, сделав толстый мазок. Мазок обезжиривают эфиром, фиксируют и окрашивают (по Цилю) с обесцвечиванием серной кислотой и спиртом.

Так же как и вышеописанные способы, метод флотации выявляет наличие в молоке и непатогенных кислотоупорных бактерий, но он, по исследованиям М. М. Дрябиной, дает более точные показатели по сравнению с центрифугированием и пригоден к использованию в самых примитивных лабораторных условиях.

Люминесцентная микроскопия заслуживает большого внимания, так как она является более надежным и быстрым методом при исполнении.

Лучшие результаты получают при окраске мазок смесью люминесцентных красителей аурумина и родамина в течение 10 мин. (0,1 г аурумина и 0,01 г. родамина на 100 мл дистиллированной воды). После выдерживания краски мазки промывают водой и обесцвечивают солянокислым спиртом (3 мл соляной кислоты + 97 мл 70%-ного спирта) Затем опять промывают водой, обрабатывают 2 мин кислым фуксином (1 г кислого фуксина и 1 мл ледяной уксусной кислоты на 0,5 л дистиллированной воды) и метиленовой синью Леффлера, еще раз промывают водой и высушивают мазки на воздухе.

Микобактерии туберкулеза на темном фоне выглядят резко очерченными, с характерной зернистостью и светятся золотисто-оранжевым цветом.

Для просмотра мазков авторы рекомендуют пользоваться люминесцентным микроскопом МЛ-1 или обычным микроскопом МБИ-1, снабженным иллюминатором ОИ-17 и осветителем ОИ-18 (кварцевая лампа с дросселем).

Обнаружение возбудителя бруцеллеза. Кольцевая реакция. В агглютинационные пробирки наливают 1 мл исследуемого молока и добавляют каплю цветного бруцеллезного антигена (смыв культуры бруцелл, окрашенный гематоксилином). Для равномерного распределения антигена в молоке содержимое пробирки встряхивают и пробирки ставят в термостат при 37—39°C на час, после чего читают реакцию.

Наиболее ясные показатели реакции наблюдаются после дополнительной выдержки пробирок в течение часа при комнатной температуре.

Положительная реакция характеризуется, тем, что в верхнем слое пробирки появляется кольцо, окрашенное в интенсивно синий цвет при некотором просветлении содержимого пробирки.

Отрицательная реакция — равномерное окрашивание содержимого. Слой сливок остается белого или коричневого цвета.

Сомнительная реакция — наличие слабого окрашивания кольца без просветления содержимого пробирки.

По наблюдениям И. И. Архангельского и В. М. Карташовой, данная реакция пригодна для исследования фляжного молока, если оно содержит молоко хотя бы одной бруцеллезной коровы.

При исследовании молока овец кольцевой реакцией рекомендуется разводить молоко 10—20%-ным раствором хлорида натрия или молоком коровы (здоровой) в соотношении 1:1.

Молоко повышенной кислотности (32—33°Т), молозиво, молоко коров, больных маститом, и содержимое молочной железы сухостойных коров не дают правильных показателей по кольцевой реакции. Пробы молока, консервированные фенолом или формалином, разведенные пополам водой, и свежие сливки после их разведения 10%-ным раствором хлорида натрия 1:1 можно исследовать по кольцевой реакции.

Реакция заключается в том, что добавленный в молоко бруцеллезной коровы окрашенный антиген соединяется (склеивается) с антителом. Возникший комплекс, антитело + антиген адсорбируется на жировых шариках, которые при температуре реакции поднимаются на поверхность содержимого пробирки, образуя кольцо синего цвета. При отсутствии антител антиген распределяется равномерно в молоке и синее кольцо не образуется.

Реакция агглютинации. К 10 мл теплого молока (35—37°С) добавляют 5 капель 10%ного сычужного фермента (на физиологическом растворе) и помещают на 5 мин в водяную баню при температуре 38—40°С для быстрого свертывания. Свернувшееся молоко обводят стеклянной палочкой по стенке пробирки, центрифугируют и полученную прозрачную надосадочную жидкость (сыворотку) используют для исследования. Для реакции берут по 1 мл сыворотки в шести разведениях (1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 и 1:160), добавляют в каждую пробирку по 0,5 мл стандартного антигена, затем пробирки встряхивают и помещают на 30 мин в термостат при 37°С.

После выдержки в термостате пробы центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин и читают реакцию.

Положительная реакция — в пробирке появляется осадок в виде круглой шляпки, которая при взбалтывании разбивается на хлопья и комочки.

Отрицательная реакция — осадок при взбалтывании образует равномерную муть.

Одновременно ставят два контроля: а) контроль антигена на самоагглютинацию: берут 0,5 мл антигена и добавляют вместо разведения сыворотки физиологический раствор; б) контроль сыворотки на спонтанную агглютинацию: берут наименьшее разведение сыворотки 1:5 и вместо антигена добавляют физиологический раствор.

Для осаждения казеина вместо сычужного фермента можно применять уксусную кислоту.

Обнаружение стафилококков в молоке. Молоко, творог, брынза, масло и другие молочные продукты представляют собой благоприятную среду для роста стафилококков и образования токсина.

Определение стафилококков начинают с бактериоскопии, которая дает приблизительное представление о степени обсемененности продукта. Исследуемый материал засевают на мясопептонный агар с добавлением 7,5% хлорида натрия и оставляют в термостате при температуре 37°C на 18—48 ч, после чего изучают выросшие колонии. Они круглые с ровными краями, вызывают помутнение на стафилококков. Из этих колоний берут мазок, окрашивают по Граму и изучают морфологию микроорганизмов.

Следует отметить, что образование пигмента у пигментированных стафилококков иногда идет замедленно и при комнатной температуре может наступить через 2—3 суток. Выросшие колонии изучают под микроскопом и "высевают на кровяной агар. Посевы на кровяном агаре изучают через 24 ч после выдержки в термостате при температуре 37°C. Токсигенные штаммы стафилококков, как правило, вызывают в среде (на кровяном агаре) гемолиз, что проявляется возникновением вокруг колоний зон просветления.

Реакция плазмокоагуляции. 8 мл свежей крови кролика смешивают с 2 мл 5%ного раствора лимоннокислого натрия. Плазму,

полученную после центрифугирования этой смеси, отсасывают и разводят физиологическим раствором в соотношении 1:4, разливают в пробирки по 0,5 мл, вносят в пробирки по одной петле суточной культуры (агаровой) стафилококка и ставят в термостат при температуре 37°C.

Наблюдение за пробирками, поставленными в термостат, проводят через 1, 2, 3 и 24 ч. Токсигенные штаммы стафилококка коагулируют плазму крови в течение 2—10 ч, чаще всего в течение 4 ч. При постановке реакции плазмокоагуляции ставится контроль — плазма без культуры.

Исследование молока на наличие стафилококкового токсина. В бактериологические пробирки наливают 2 мл от каждой исследуемой пробы молока, а для контроля в одну пробирку — 2 мл физиологического раствора. Во все пробирки добавляют по 1 капле разведенных 5%-ным раствором лимоннокислого натрия эритроцитов кролика, тщательно встряхивают и помещают на 1 ч в термостат при температуре 37°C, после чего выдерживают 1 ч при комнатной температуре, затем центрифугируют при 1000 об/мин в течение 10 мин и учитывают реакцию. Если молоко в процессе исследования свернется, то такие пробы учету не подлежат.

Положительная реакция (токсин имеется) — эритроциты лизируются, столбик молока окрашен в равномерно красный цвет.

Отрицательная реакция (отсутствие токсина) — в испытуемой пробе молоко над осевшими эритроцитами остается белым.

Контрольная пробирка — эритроциты оседают на дно, физиологический раствор над ними не окрашивается.

Пробы молока, давшие положительные реакции, проверяют повторно со специфической антитоксической стафилококковой сывороткой. Для этого берут две пробирки, наливают в каждую по 2 мл испытуемого молока, в первую добавляют 1 каплю эритроцитов кролика, во вторую — 1 каплю эритроцитов кролика и 2 АЕ (антитоксическая единица) указанной сыворотки. Пробы выдерживают 1 ч в термостате при 37°C и 1 ч при комнатной температуре, затем центрифугируют при 1000 об/мин в течение 10 мин и окончательно учитывают результат.

Если в пробирке без сыворотки будет гемолиз, а в пробирке с сывороткой гемолиз отсутствует и столбик молока над эритроцитами остается белым, реакция считается специфической. При гемолизе в обеих пробирках реакция считается неспецифической.

Для получения эритроцитов кровь берут из уха кролика, собирают в пробирку с 5%-ным раствором лимоннокислого натрия (1 часть раствора на 4 части крови). Полученную кровь центрифугируют, плазму отсасывают, а эритроциты трижды отмывают на центрифуге физиологическим раствором. Затем физиологическим раствором разводят эритроциты в соотношении 1:2 и хранят в холодильнике при температуре плюс 3—5°C.

Антитоксическую стафилококковую сыворотку получают по разрядке. Если высушенная сыворотка содержит 60 ЛЕ в 1 мл, то в ампулу добавляют 3 мл физиологического раствора, а при 80 АЕ — 4 мл (в 0,1 мл такого разведения содержится 2 АЕ). Нативную (невысушенную) сыворотку добавляют в количестве 2 АЕ без разведения физиологическим раствором.

Определение в молоке сальмонелл. Наиболее достоверными по определению в молоке бактерий рода сальмонелла и их типизации являются бактериологические методы, описанные в соответствующих руководствах.

Из серологических методов по определению в молоке сальмонелл рекомендована кольцевая реакция с молоком. Техника постановки и учет реакции являются аналогичными кольцевой реакции с молоком, диагностируемым на бруцеллез. Хотя чувствительность и специфичность реакции не является стопроцентной, однако, простота выполнения и быстрота учета позволяют широко применять ее в производственных условиях.

Глоссарий

1. Прокариоты – ядерное вещество и органеллы не отделены от цитоплазмы специальными оболочками.
2. Эукариоты – ядра и органеллы (митохондрии и хлоропласты) отделены от цитоплазмы мембранами.
3. Микрококки – образуются делением кокков в разных плоскостях и располагаются беспорядочно, одиночно.

4. Стафилококки – скопление кокков, часто напоминают гроздь винограда.
5. Диплококки – кокки, расположенные попарно.
6. Стрептококки – образуются делением кокков в одной плоскости, но при этом клетки располагаются цепочкой.
7. Тетракокки – кокки, располагающиеся по четыре.
8. Сарцины – по форме напоминают пакеты или тюки.
9. Микобактерии – возбудитель туберкулеза, окрашиваются по Циль-Нильсену.
10. Аммонификаторы – проявляют свое действие в нейтральной или слабощелочной средах, то есть до развития молочнокислых бактерий или после фазы плесневых грибов и дрожжей, а также при низкой температуре.
11. маслянокислые микробы – содержатся в почве, на растениях, на предметах ухода и при несоблюдении чистоты попадают в молоко. В анаэробных условиях они разлагают молочный сахар с образованием масляной кислоты и газов.
12. Зооатропонозы – группа заразных болезней, общих для животных и человека. З. Передаются от одного вида животного к другому и от животного к человеку незначительна.
13. Антропонозы – болезни, которые передаются от человека к человеку.
14. Сальмонеллы – острые желудочно-кишечные болезни, вызываемые токсинами, которые вместе с молоком могут попадать в организм человека.
15. Мастит (воспаление вымени) может быть вызван микробами, которые проникли в молочную железу.
16. Пастеризация – способ обезвреживания молока при температуре 63-95⁰С, в результате чего погибает до 99,9% вегетативных форм микробов.
17. Длительная пастеризация – молоко, нагреваемое до 63-65⁰С в течение 30 минут.
18. Кратковременная пастеризация проводится без выдержки при температуре 72-74⁰С в течение 15-20 с.
19. Моментальная пастеризация – проводится без выдержки при температуре 85-87⁰С.

Список литературы

1. Асонов Н.Р. Микробиология. – М.: Колос, 2001.
2. Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов. Санитарные требования и нормы СанПиН 2.3.2.562-96. - М., 1997.
3. Коряжнов В.П., Макаров В.А. Практикум по ветеринарно-санитарной экспертизе молока и молочных продуктов. – М.: Колос, 1981.
4. Степаненко П.П. Микробиология молока и молочных продуктов. – М., 2002.

Лабораторное занятие №8 Микробиологическое исследование масла. Микробиологическое исследование сыра.

Цель: Ознакомиться с методами бактериологического исследования масла.

План

1. Отбор и подготовка к исследованию проб масла;
2. Микроскопическое исследование масла;
3. Питательные среды, используемые для определения общего количества микроорганизмов, протеолитических бактерий, дрожжей и плесневых грибов;
4. Критерии оценки качества масла.

Вопросы для обсуждения и изучения

1. Условия развития микроорганизмов в масле.
2. Источники микрофлоры масла.
3. Состав микрофлоры и его изменения в процессе хранения масла.
4. Пороки масла микробного происхождения.

Задания:

Общие:

1. Отобрать пробы масла для микробиологического исследования.

2. Записать в тетрадь схему бактериологического исследования масла.

Индивидуальные:

1. Приготовить мазки из проб сладкосливочного и кислосливочного масла,

2. Окрасить их по Граму, зарисовать микрокартину.

3. Сделать посеvy масла в бактериологические чашки с МПА, суловым агаром, молочным агаром, агаром с гидролизovanным молоком и мелом, в среду Кесслера. Поместить посеvy в термостат.

Краткие теоретические и учебно-методические материалы

Отбор и подготовка к бактериологическому исследованию проб масла.

Пробы масла отбирают стерильном щупом из 2-3 мест на расстоянии 3-5 см от края. Из щупа берут шпателем 20 гр. продукта и помещают в стерильную банку. Масло в банке расплавляют на водяной бане при 40-45°C и перемешивают. Затем 1 мл расплавленного масла стерильной пипеткой вносят в пробирку с 9 мл стерильной воды (температура 35-40°C) и получают разведение 1:10. Из этой пробирки делают все последующие разведения – 2, 3, 4, 5.

Два раза в месяц в масле определяют количество протеолитических бактерий, дрожжей, плесневых грибов и бродильный титр. В сладкосливочном масле определяют также общее количество бактерий посевом 2, 3, 4, 5 разведении на МПА.

Количество молочнокислых бактерий определяют посевом 3, 4, 5 разведении на агаре с гидролизovanным молоком и мелом.

Количество протеолитических бактерий определяют посевом: на молочный агар 1, 2, 3, 4 разведении сладкосливочного и 1, 2, 3 разведении кислосливочного масла.

Количество микроскопических грибов и дрожжей подсчитывают на суловом агаре или среде Сабуро при высеве из 1 и 2 разведения.

Бродильный титр устанавливают посевом 0, 1, 2, 3, 4 разведении разведении в две параллельные пробирки со средой Кесслера по 1 мл каждого разведения.

Посевы помещают в термостат при температуре 30°C на 2-3 суток. Затем проводят количественный учет микрофлоры общепринятым методом.

Для приготовления мазков масло нагревают в центрифужных пробирках на водяной бане при температуре 70°C. Затем центрифугируют 10 минут при 1500 оборотах/ минуту. Надосадочную жидкость сливают, а из осадка готовят мазки. Мазки фиксируют смесью спирта и эфира, окрашивают по Граму и микроскопируют.

В свежеприготовленном масле обнаруживаются молочнокислые стрептококки. В мазках из старого масла встречаются дрожжи и микроскопические грибы.

Схема бактериологического исследования сливочного масла.

Цель исследования	Посев на среду	Разведение масла	
		сладко-сливочного	кисло-сливочного
Определение общего количества бактерий	Мясо-пептонный агар	3,4,5	4,5,6
Количество протеолитических бактерий	Молочный агар	2,3,4	2,3
Количество молочнокислых бактерий	Обезжиренное молоко или агар с гидролизованым молоком и мелом	2,3,4,5 1,2,3	- -
Количество дрожжей и плесеней	Сусловый агар или агар Сабуро	1,2	1,2
Бродильный титр (по 1 мл. каждого разведения)	Среда Кесслера	0,1,2,3,4	0,1,2,3

Бактериологические нормы оценки масла

Продукт	Количество микроорганизмов в 1 гр.	Оценка
---------	------------------------------------	--------

	Общее количество бактерий	Гнилостных бактерий	Плесеней	
Масло сладкосливочное свежее	до 100000	до 500	0	отлично
Масло кисломолочное свежее	не ограничено	до 500	0	отлично
Масло сладкосливочное 10-дневное	до 500000	до 5000	0	отлично
Масло кисломолочное 10 дневное	не ограничено	до 5000	0	отлично
Масло сладкосливочное свежее	10000-100000	500-2000	до 10	хорошо
Масло кисломолочное свежее	не ограничено	500-2000	до 10	хорошо
Масло сладкосливочное 10-дневное	500000-1000000	5000-10000	до 10	хорошо
Масло кисломолочное 10-дневное	не ограничено	5000-10000	до 10	хорошо
Масло сладкосливочное свежее	100000-1000000	2000-20000	10-100	удовлетв.
Масло кисломолочное свежее	не ограничено	2000-20000	10-100	удовлетв.
Масло сладкосливочное свежее	свыше 1 млн.	свыше 20000	свыше 100	плохо
Масло кисломолочное свежее	не ограничено	свыше 20000	свыше 100	плохо

Глоссарий

1.Анилиновые красители – продукт перегонки, каменноугольных смол, мелкие кристаллические порошки разных оттенков.

2.Кокки – бактерии сферической формы, которые в зависимости от плоскостей деления и расположения в препарате могут делиться на несколько групп.

3.Термофильные молочнокислые бактерии – бактерии, развивающиеся при $T = 40-45^{\circ}\text{C}$. При сбраживании сахаров образуют до 3,5% молочной кислоты. Молоко свертывают в течение 6-12 ч.

4.Мезофильные молочнокислые бактерии развиваются при температуре 30°C и располагаются цепочкой, они образуют меньше продуктов жизнедеятельности, кислотность продукта не превышает 180°C .

5.Гетероферментативные молочнокислые бактерии встречаются на растениях, сбраживают сахара с образованием большого количества спирта и углекислого газа.

6.Брожение – анаэробный окислительно-восстановительный процесс, вызываемый как живыми клетками микроорганизмов, так и выделяемыми ими ферментами.

7.Молочнокислые стрептококки – типичный представитель молочнокислого брожения, находится почти во всех молочных продуктах.

8.Ацидофильная палочка – постоянный обитатель желудочно-кишечного тракта молодняка с/х-ных животных, откуда она и выделяется.

9.Пропионовокислое брожение – сходно с молочнокислым брожением. Вызываются пропионово-кислыми бактериями, которые находятся в молоке, молочных продуктах и почве. Они легко сбраживают молоко. Широко используют в сыроделии

10.Маслянокислое брожение – образуется масляная кислота – летучая жидкость с неприятным запахом. Возбудители его являются фиксаторами атмосферного азота.

Список литературы

1.Асонов Н.Р. Микробиология. – М.: Колос, 2001.

2. Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов. Санитарные требования и нормы СанПиН 2.3.2.562-96. - М., 1997.

3. Молоко и молочные продукты (микробиологический анализ) ГОСТ 9225-84.

4. Степаненко П.П. Микробиология молока и молочных продуктов. – М., 2002.

Микробиологическое исследование сыра.

Цель: Ознакомиться с методами бактериологического исследования сыра, используемыми в сыроделии.

План

1. Источники первичной микрофлоры сыра.
2. Сыропригодность молока.
3. Развитие микробиологических процессов при выработке сыра.
4. Микробиологический контроль производства сыров.

Вопросы для обсуждения и изучения

1. Значение микроорганизмов в сыроделии.
2. Развитие микробиологических процессов при выработке сыра.
3. Пороки сыров микробного происхождения.

Задания:

Общие:

1. Ознакомиться с методиками, применяемыми с целью определения пригодности молока для сыроделия (пробой на брожение и сычужно-бродильной пробой).

Индивидуальные:

1. С соблюдением правил асептики приготовить разведения данного образца сыра: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000, 1:10000000, 1:100000000.
2. Определить бродильный титр данного образца сыра путем посева 1 мл I, 2, 3 и 4 разведения в две параллельные пробирки со средой Кесслера.

3. Определить наличие и количество маслянокислых бактерий в пробе сыра путем посева 1 мл в две параллельные пробирки со стерильным обезжиренным молоком. После посева пробирки следует прогреть в водяной бане при 90°C в течение 10 минут и выдержать в термостате при 30°C в течение 3 суток.

Количество маслянокислых бактерий устанавливается методом предельных разведений с учетом наличия в посевах газа, запаха масляной кислоты и обнаружения в мазках споровых форм бактерий, имеющих вид барабанной палочки или веретена.

4. Определить количество дрожжей посевом 1,2,3,4 разведений на среду Сабуро или сусловый агар.

5. Количество маммококков, вызывающих пептонизацию казеина, определить посевом 6,7,8,9 разведений в две параллельные пробирки со стерильным обезжиренным молоком

6. Количество молочнокислых бактерий определить посевом 6,7,8,9 разведений в пробирки со стерильным обезжиренным молоком.

7. Провести микроскопическое исследование данного образца сыра и сделать заключение.

Краткие теоретические и учебно-методические материалы

Для определения качественного состава микрофлоры молока, используемого в сыроделии, применяют пробу на брожение и сычужно-бродильную пробу, позволяющие по характеру сгустка судить о присутствии различных групп микробов в молоке.

Проба на брожение

Применяется для определения пригодности молока для сыроделия. В стерильные пробирки на 30-40 мл наливают молоко, закрывают ватными пробками и ставят в термостат или водяную баню при температуре 38°C. Через 12 и 24 часа проводят наблюдения, отмечая время свертывания, запах, вкус, кислотность.

Молоко считается доброкачественным, если свертывание наступило или лишь начинается через 12 часов. Нельзя применять в сыроделии молоко, давшее сгусток со вспучиванием или пузырьками газа. Окончательную оценку проводят через 24 часа и молоко по качеству относят к одному из четырех классов (таблица).

Класс	Качество молока	Характеристика сгустка
1	Хорошее	Наблюдается начало свертывания без выделения сыворотки и пузырьков газа
2	Удовлетворительное	Сгусток с полосками и пустотами, заполненными сывороткой, структура сгустка мелкозернистая, слабое выделение сыворотки
3	Плохое	Сгусток с обильным выделением зеленоватой или беловатой сыворотки, крупнозернистый, пузырьков газа.
4	Очень плохое	Сгусток разорван и пронизан пузырьками газа, вспучен как губка.

Молоко 1, 2 классов для сыроделия пригодно, 3, 4 - непригодно, так как в таком молоке могут присутствовать газообразующие бактерии группы кишечной палочки.

Сычужно-бродильная проба.

В пробирку с 30 мл молока вносят 1 мл сычужного фермента (0,5 гр. готового сычужного порошка в 100 мл теплой воды), перемешивают и выдерживают течение 12 часов в термостате при температуре 38-40°C. Доброкачественное молоко свертывается в течение 20 минут, а через 12 часов дает совершенно однородный плотный сгусток с прозрачной сывороткой.

По истечению 12 часов пробы просматривают и относят к одному из трех классов в соответствии с нижеследующей таблицей:

Класс	Качество молока	Характеристика сгустка
1	Хорошее	Сгусток с гладкой поверхностью, без глазков на продольном разрезе
2	Удовлетворительное	Сгусток с единичными глазками, мягкий на ощупь, разорван, но не вспучен

3	Плохое	Сгусток с многочисленными глазками, губчатый, мягкий на ощупь, вспучен, всплыл наверх, или вместо сгустка наблюдается хлопьевидная масса
---	--------	--

Отбор проб сыра, подготовка материала к посеву и приготовление мазка.

Пробы берут стерильным щупом, который вводят в середину куска, предварительно прижигая раскаленным шпателем выбранный участок поверхности.

Из щупа берут 10 гр. сыра. В стерильной ступке растирают 10 гр. сыра с 10 мл стерильной подогретой до 45°C воды (разведение 1:10) и затем готовят последующие разведения с соблюдением правил асептики, как указано для молока и масла.

Один раз в декаду после прессования, а также в процессе созревания сыра (при обнаружении признаков вспучивания) определяют бродильный титр, количество маслянокислых бактерий и дрожжей.

В 0,1 гр. доброкачественного сыра не должна содержаться кишечная палочка. Количество спор маслянокислых бактерий не должно превышать 100 в 1 гр. продукта.

Для микроскопического исследования готовят мазки следующим образом:

Первый способ: тонкий кусочек сыра сдавливают между двумя предметными стеклами, затем стекла разжимают и оставшийся на них мазок-отпечаток фиксируют и обезжиривают спирт-эфиром и красят по Граму или метиленовой синькой.

Второй способ' прижигают поверхность сыра раскаленным шпателем. Пробу берут стерильным инструментом из глубины сыра (около 1 гр.), помещают ее в пробирку со спиртом и выдерживают до анализа.

За несколько часов до анализа спирт сливают и заменяют тем же количеством эфира или хлороформа. Перед исследованием сырную массу переносят в фарфоровую ступку до испарения эфира или хлороформа.

Сыр растирают с 3-5 мл горячей воды. Из полученной смеси делают тонкие мазки, высушивают на воздухе, фиксируют спирт-эфиром и окрашивают метиленовой синькой.

При нарушении технологии приготовления сыров, в них наряду с микроорганизмами закваски, могут развиваться газообразующие бактерии из группы кишечной палочки, маслянокислые бактерии, вызывающие порчу продукта.

Глоссарий

1. Кокки – бактерии сферической формы, которые в зависимости от плоскостей деления и расположения в препарате могут делиться на несколько групп.

2. Термофильные молочнокислые бактерии – бактерии, развивающиеся при $T = 40-45^{\circ}\text{C}$. При сбраживании сахаров образуют до 3,5% молочной кислоты. Молоко свертывают в течение 6-12 ч.

3. Мезофильные молочнокислые бактерии развиваются при температуре 30°C и располагаются цепочкой, они образуют меньше продуктов жизнедеятельности, кислотность продукта не превышает 180°C .

4. Гетероферментативные молочнокислые бактерии встречаются на растениях, сбраживают сахара с образованием большого количества спирта и углекислого газа.

5. Брожение – анаэробный окислительно-восстановительный процесс, вызываемый как живыми клетками микроорганизмов, так и выделяемыми ими ферментами.

6. Молочнокислые стрептококки – типичный представитель молочнокислого брожения, находится почти во всех молочных продуктах.

7. Ацидофильная палочка – постоянный обитатель желудочно-кишечного тракта молодняка с/х-ных животных, откуда она и выделяется.

8. Пропионовокислое брожение – сходно с молочнокислым брожением. Вызываются пропионово-кислыми бактериями, которые находятся в молоке, молочных продуктах и почве. Они легко сбраживают молоко. Широко используют в сыроделии

9. Маслянокислое брожение – образуется масляная кислота – летучая жидкость с неприятным запахом. Возбудители его являются фиксаторами атмосферного азота.

Список литературы

1. Асонов Н.Р. Микробиология. – М.: Колос, 2001.
2. Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов. Санитарные требования и нормы СанПиН 2.3.2.562-96. - М., 1997.
3. Молоко и молочные продукты (микробиологический анализ) ГОСТ 9225-84.
4. Степаненко П.П. Микробиология молока и молочных продуктов. – М., 2002.

Лабораторное занятие №9 Бактериологический контроль качества заквасок, применяемых при изготовлении молочных продуктов.

Цель: Ознакомиться с методами микробиологического контроля качества заквасок.

План

1. Требования к молоку, используемому для производства заквасок.
2. Приготовление и применение заквасок.
3. Пороки заквасок.

Вопросы для обсуждения и изучения

1. Классификация заквасок.
2. Принципы подбора культур в состав заквасок.
3. Микробиологический контроль качества заквасок.

Задания:

Общие:

1. Познакомиться с методикой микробиологического контроля качества заквасок.

Индивидуальные:

1. Приготовить мазки из закваски, окрасить их по Граму, зарисовать микрокартину, сделать заключение.
3. Определить наличие диацетина и ацетоина в закваске.
4. Определить наличие углекислого газа в закваске.

5. Сделать посе́вы закваски в пробирки со средой Кесслера, в стерильное обезжиренное молоко с добавлением парафина и без парафина. Поместить посе́вы в термостат.

Краткие теоретические и учебно-методические материалы

На предприятиях молочной промышленности применяют чистые культуры бактерий, выпускаемые в виде жидких и сухих заквасок, а также бактериальных концентратов. Жидкие закваски - это чистые культуры молочнокислых бактерий, выращенных в стерильном молоке.

Преимущество этих заквасок - активное состояние микрофлоры и чистота, а недостаток - незначительный срок практической годности (до 2-х недель при температуре 4-6°C).

Сухие закваски - это чистые культуры молочнокислых бактерий, выращенные в стерильном молоке, которые после сквашивания подвергаются обезвоживанию.

Известны следующие способы приготовления сухих заквасок:

1) высушивание культур в сушильном шкафу при 35-40°C в течение 1-2 ч.

2) высушивание на распылительной сушке при температуре поступающего воздуха 130-140°C (температура в зоне распыления 48-50°C). Недостаток - длительное нахождение микрофлоры закваски при высокой температуре приводит к частичной потере ее активности.

3) высушивание методом сублимации - удаление влаги из клеток, находящихся в замороженном состоянии при высоком вакууме. Эта закваска наиболее активна, в 1 г содержится миллиарды бактерий. Срок годности сухих заквасок 3 месяца.

Микробиологический контроль качества заквасок включает:

1) проверку её активности (время сквашивания молока).

2) содержание диацетина и ацетоина.

3) наличие углекислого газа.

4) определение наличия посторонней микрофлоры бактериологическим методом:

а) кишечной палочки,

б) маслянокислых бактерий (анаэробов).

в) аэробных спорообразующих микроорганизмов.

5) определение наличия посторонней бактериальной флоры в микроскопическом препарате.

1. Определение активности закваски.

Активность закваски определяется по времени свертывания пастеризованного или кипяченого молока при внесении 5% жидкой закваски или 0,1 г сухой закваски на 200 мл молока. Для закваски молочнокислых стрептококков свертыванию молока должно быть не более 7 часов, для закваски молочнокислых палочек не более 6 часов.

2. Содержание диацетила и ацетоина.

Закваски, в которых присутствуют ароматообразующие стрептококки, контролируют на содержание диацетила и ацетоина. Закваску фильтруют через бумажный фильтр и 3 капли фильтрата смешивают с 3 каплями 40% водного раствора КОН. Если в закваске имеются значительное количество ацетона и диацетила, то через 10-15 минут появится ярко-розовое окрашивание.

3. Наличие углекислого газа в закваске.

Производственную закваску хорошо перемешивают и 20 мл наливают в пробирки диаметром 15 мм, которые помещают в кружку с холодной водой. Воду в кружке нагревают до 90°C и, не вынимая пробирки из воды, отмечают уровень поднятия сгустка.

Если закваска содержит углекислый газ, что свидетельствует о присутствии ароматообразующих стрептококков, то сгусток становится губчатым и приподнимается над сывороткой на 0,6-3 мм и более. При отсутствии углекислого газа он совсем не поднимается, либо поднимается незначительно на 0,3-0,5 мм и не имеет явно выраженной губчатости.

4. Бактериологическое исследование.

1) Кишечная палочка учитывается высевом 3 мл закваски в среду Кесслера. Присутствие кишечной палочки в 3 мл закваски не допускается.

2) Споровые маслянокислые бактерии (анаэробы) выявляются посевом в стерильное обезжиренное молоко с добавлением парафина.

3) Споровые аэробные микроорганизмы выявляют посевом в стерильное обезжиренное молоко без парафина. После посева про-

бирки помещают в водяную баню при температуре 85°C и выдерживают в ней Юмин. Затем пробирки охлаждают и помещают в термостат, при 30°C на двое суток.

5. Микроскопическое исследование.

При микроскопировании препарата из закваски в 10 полях зрения должны быть видны:

1) В закваске для сливочного масла, сметаны, творога, простокваши и сыров с низкой температурой второго нагревания - только молочнокислые стрептококки (цепочки, диплококки).

2) В закваске для ряженки, варенца - молочнокислые стрептококки в виде диплококков и цепочек, и в небольшом количестве палочки.

3) В закваске для южной простокваши, йогурта молочнокислые стрептококки и палочки.

4) В закваске для ацидофильного молока и ацидофильной пасты только ацидофильные палочки.

5) В закваске кефирно-грибковой - молочнокислые стрептококки дрожжи, палочки, в производственной преобладают молочнокислые стрептококки, единичные дрожжи и палочки.

Глоссарий

1.Кокки – бактерии сферической формы, которые в зависимости от плоскостей деления и расположения в препарате могут делиться на несколько групп.

2.Термофильные молочнокислые бактерии – бактерии, развивающиеся при $T = 40-45^{\circ}\text{C}$. При сбраживании сахаров образуют до 3,5% молочной кислоты. Молоко свертывают в течение 6-12 ч.

3.Мезофильные молочнокислые бактерии развиваются при температуре 30°C и располагаются цепочкой, они образуют меньше продуктов жизнедеятельности, кислотность продукта не превышает 180°C.

4.Гетероферментативные молочнокислые бактерии встречаются на растениях, сбраживают сахара с образованием большого количества спирта и углекислого газа.

5.Брожение – анаэробный окислительно-восстановительный процесс, вызываемый как живыми клетками микроорганизмов, так и выделяемыми ими ферментами.

6. Молочнокислые стрептококки – типичный представитель молочнокислого брожения, находится почти во всех молочных продуктах.

7. Ацидофильная палочка – постоянный обитатель желудочно-кишечного тракта молодняка с/х-ных животных, откуда она и выделяется.

8. Пропионовокислое брожение – сходно с молочнокислым брожением. Вызываются пропионово-кислыми бактериями, которые находятся в молоке, молочных продуктах и почве. Они легко сбраживают молоко. Широко используют в сыроделии

9. Маслянокислое брожение – образуется масляная кислота – летучая жидкость с неприятным запахом. Возбудители его являются фиксаторами атмосферного азота.

Список литературы

1. Асонов Н.Р. Микробиология. – М.: Колос, 2001.
2. Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов. Санитарные требования и нормы СанПиН 2.3.2.562-96. - М., 1997.
3. Молоко и молочные продукты (микробиологический анализ) ГОСТ 9225-84.
4. Степаненко П.П. Микробиология молока и молочных продуктов. – М., 2002.

Список рекомендованной литературы

1. Мудрецова-Висс К.А. Микробиология, санитария и гигиена [текст] – учебник - Москва: ИНФРА-М, ФОРУМ, 2014. - 400 с
2. Беляев А. Г. Основы микробиологии [Текст]: учебное пособие / А. Г. Беляев, С. А. Чугунов, Е. Ю. Потреба. - Курск: ЮЗГУ, 2015. - 174 с.
3. Жарикова Г. Г. Микробиология продовольственных товаров. Санитария и гигиена: [Текст]: учебник / Г. Г. Жарикова. - М.: Академия, 2005. - 304 с.

4. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Отбор проб с туши для микробиологического анализа: [Текст] / Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии. - Введ. 2011-12-13. - М.: Стандартинформ, 2013. - 15 с.

5. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных: [Текст]. - Введ. 29.11.2010. - М.: Стандартинформ, 2011. - 14 с.