

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические указания
по выполнению лабораторных работ
по дисциплине «**Пищевая микробиология**»
для студентов направления подготовки
19.04.01 Биотехнология

Направленность (профиль) Биотехнология производства продукции из растительного сырья,
виноделия и бродильных производств

УКАЗАНИЯ ПО ТЕХНИКЕ БЕЗОПАСНОСТИ К ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

Для получения достоверных результатов исследований, обеспечения безопасности и получения достоверных результатов при выполнении лабораторных работ по микробиологии молока и пищевых продуктов необходимо соблюдать следующие правила.

1. Каждый студент в лаборатории работает на постоянном месте, выполняя задания индивидуально. Студентам запрещается работать в лаборатории без присутствия преподавателя или лаборанта.
2. На рабочем месте не должно быть посторонних предметов (в том числе портфелей и сумок).
3. В лаборатории запрещается курение и прием пищи.
4. Студент должен работать в чистом застегнутом халате, волосы должны быть подобраны под специальную шапочку или косынку.
5. Перед началом работы обязательно проверяют наличие и исправность приборов, посуды, спиртовых горелок и др. О замеченных недостатках, неисправностях сообщают преподавателю или лаборанту.
6. При работе с культурами микроорганизмов необходимо соблюдать все правила микробиологической техники. На пробирках, колбах, чашках Петри должна быть сделана надпись, содержащая название культуры, дату засева, фамилию студента и номер группы.
7. Все предметы, использованные при работе с культурами, должны быть обеззаражены либо обжиганием в пламени горелки (петли, иглы), либо погружены в дезинфицирующий раствор (предметные и покровные стекла, пипетки, шпатели).
8. В конце занятия студент должен привести в порядок рабочее место и сдать его лаборанту, вымыть руки с мылом.

Лабораторная работа 1, 2

Выделение чистых культур и исследование свойств микроорганизмов, применяющихся в производстве пищевых продуктов (посев, учет)

Цель занятия: выделить и исследовать свойства чистых культур молочнокислых микроорганизмов и дрожжей, используемых в пищевой промышленности,

Теоретические положения

Основные этапы получения новых чистых культур для заквасок:

- выбор источников и отбор образцов;
- обогашение – посев на жидкую питательную среду, культивирование в оптимальных условиях;
- выделение – посев на плотную питательную среду, отбор типичных выросших колоний чистых культур, их дифференциация и идентификация;
- исследование свойств и определение производственной и биологической ценности (пересев чистой культуры в стерильное молоко, проверка на эффективность кислотообразования и сквашивания, чувствительность к бактериофагам, стабильность сохранения свойств, резистентность и др.);
- коллекционирование ценных штаммов.

Из проверенных и отобранных ценных штаммов составляют коллекцию, пересев проводят не реже 1 раза в месяц. Т.к. возможно снижение биохимической активности, постоянно проверяют чистоту (наличие посторонней микрофлоры), активность кислотообразования, биохимические и органолептические свойства. Возможно хранение в замороженном при $-18...-25^{\circ}\text{C}$ состоянии в течение 4-6 месяцев или в высушенном состоянии в течение нескольких лет.

Для выделения мезофильных гомоферментативных молочнокислых лактококков делают посев сырого молока, самоквасных продуктов или растений из местности с умеренным климатом в стерильное молоко, которое термостатируют при $30-35^{\circ}\text{C}$. Происходит сквашивание, производят поверхностный посев сквашенных образцов на плотную среду АГМ, термостатируют при $30-35^{\circ}\text{C}$. Из всех выросших типичных колоний проводят посев в пробирки со стерильным обезжиренным молоком и их термостатирование. Проводят отбор пробирок, в которых молоко свернулось за 16-18 ч, готовят препараты и микроскопируют их, проверяя на чистоту. Затем проводится проверка на пригодность: 5% закваски должны свернуть молоко за 5 ч, при этом сгусток должен быть ровным, плотным, сметанообразной или колющейся консистенции, вкус чистый кисломолочный, без посторонних привкусов и запахов. Проводятся также тесты на бактериофаг, термоустойчивую палочку и др.

Выделение мезофильных гетероферментативных ароматообразующих молочнокислых кокков включает естественное сквашивание (в качестве исходного образца берут сырое молоко или помещают цветки растений в стерильное молоко) при $25-28^{\circ}\text{C}$; пересев в стерильное обезжиренное молоко с добавлением цитрата натрия и дрожжевого автолизата (с витаминами и аминокислотами как факторов роста), термостатирование при $25-28^{\circ}\text{C}$; посев на плотную среду АГМ с малорастворимым цитратом кальция, термостатирование; отбор культур из колоний с осветленной зоной; посев в стерильное ОМ, сквашивание, проверку на пригодность: молоко должно сворачиваться за 16-18 ч и более, штамм должен быть устойчив к полифагу, проверяют органолептику сгустка, проводят тест на образование диацетила, ацетона и углекислого газа.

При выделении термофильных молочнокислых стрептококков проводят естественное сквашивание при 45°C ; пересев в стерильное молоко с 2% сахарозы, сквашивание при 45°C ; поверхностный посев на АГМ с сахарозой, термостатирование при 45°C ; пересев из типичных колоний в стерильное молоко, сквашивание при 45°C ; отбор пробирок, в которых молоко свернулось быстрее, чем за 16 ч; проверку на пригодность: 5% заквасочной культуры должны свертывать молоко за 3,5-5 ч, рост культуры в ГМ с 2% хлорида натрия.

Культуральные и биохимические свойства некоторых видов лактококков приведены в табл. 1.1.

Таблица 1.1 - Свойства лактококков и лейконостоков

Признаки	Lc. lactis	Lc. cremoris	Lc. diacety lactis	Leu. cremoris
Рост в среде с 4 % NaCl	+	—	+	—
Образование:				
– NH ₃ из аргинина	+	—	+	—
– CO ₂ из глюкозы	—	—	—	+
– диацетила	—	—	+	+
Время свертывания молока, ч	5–7	6–8	Более 16	Более 24
Рост в лакмусовом молоке	восстанавливает, свертывает	восстанавливает, свертывает	восстанавливает, свертывает	без изменения
Предельная кислотность в молоке, °Т	115–120	110–115	80–100	50–80

Выделение термофильных молочнокислых палочек предусматривает естественное сквашивание при 40-45°C, пересев в стерильное ОМ и сквашивание при 40-42°C; глубинный посев на АГМ, термостатирование при 40-42°C; посев в ОМ из типичных глубинных колоний после микроскопирования; отбор пробирок, в которых молоко свернулось менее чем за 16 ч; проверку на пригодность: 5% закваски должны свертывать пастеризованное молоко за 2,5-4 ч, сгусток должен быть ровным, плотным, сметанообразной или колющейся консистенции, проверка на предельную кислотность.

Для определения принадлежности выделенных лактобактерий к группе гомо- или гетероферментативных их высевают в среду с глюкозой или лактозой и после термостатирования устанавливают наличие или отсутствие газа в поплавке.

Лактобациллы вида *L. plantarum* относятся к подроду стрептобактерий. Они свертывают молоко за двое-трое суток, предельная кислотность составляет 160–180 °Т. Лактобациллы этого вида растут в гидролизованном молоке, содержащем 6 % NaCl и 20 % желчи, восстанавливают и свертывают лакмусовое молоко, не образуют аммиак из аргинина. Глюкозу расщепляют по гексозодифосфатному пути с образованием преимущественно молочной кислоты.

Лактобациллы видов *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. buchneri* относятся к подроду бетабактерий, вызывающих гетероферментативное молочнокислое брожение с образованием молочной и уксусной кислот, этанола и диоксида углерода. Бетабактерии не свертывают молоко, но при добавлении в него дрожжевого автолизата их размножение стимулируется и предельная кислотность может составить 150–160 °Т. Большинство видов бетабактерий образуют аммиак из аргинина, не свертывают лакмусовое молоко и лишь частично его восстанавливают (порозование).

Основные культуральные и биохимические свойства некоторых видов лактобацилл приведены в табл. 1.2.

Таблица 1.2 – Свойства лактобацилл

Свойства	<i>L. plantarum</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. buchneri</i>
Рост в среде с 6 % NaCl	+	—	—	—
Образование:				
– NH ₃ из аргинина	—	+	+	+
– CO ₂ из глюкозы	—	+	+	+
Время свертывания молока	2–3 суток	Не свертывается	Не свертывается	Не свертывается

Рост в лакмусовом молоке	восстанавливает, свертывает	порозовение (частичное восстановление)		
Предельная кислот- ность в молоке, °Т	160–180	–	–	–

В природе микроорганизмы находятся в определенных ассоциациях, где между отдельными видами могут складываться разнообразные отношения: симбиотические, антагонистические, паразитические. Молочнокислые бактерии проявляют антагонистические свойства по отношению ко многим микроорганизмам, как к сапрофитным, так и к патогенным. Некоторые молочнокислые бактерии являются пробиотиками, т. е. функционируют в желудочно-кишечном тракте человека. Пищевые продукты, содержащие пробиотики, считаются функциональными – полезными для здоровья.

Антагонистическую активность микроорганизмов определяют различными методами. Наиболее часто применяют чашечные или пластинчатые методы, основанные на способности антибиотических веществ диффундировать в толщу агара и задерживать рост чувствительных к данному веществу микроорганизмов.

Задания и порядок выполнения работы

1. Изучите теоретические положения работы.
2. Разработайте схему выделения заквасочной культуры по заданию преподавателя.
3. Выделите чистые культуры молочнокислых микроорганизмов из разных источников в соответствии с заданием преподавателя
4. Исследуйте морфологические, культуральные и биохимические свойства чистых культур молочнокислых кокков по заданию преподавателя в соответствии с правилами проведения микробиологических исследований (приложение 1) в следующей последовательности:

- опишите размер, форму и цвет колоний микроорганизмов на элективных плотных питательных средах (АГМ, АГМ с цитратом);

- опишите особенности роста культур в жидких питательных средах, в частности, в обезжиренном молоке, отметив характер и консистенцию сгустка, определите его кислотность;

- приготовьте фиксированные препараты культур, окрасьте их метиленовой синью, просмотрите под микроскопом в нескольких полях зрения и зарисуйте наиболее характерные виды, обратив внимание на форму, размер и взаимное расположение клеток;

- приготовьте из культур препараты «раздавленная капля», просмотрите под микроскопом, зарисуйте, сделайте вывод о форме и подвижности клеток.

3. Кратко опишите основные свойства изученных видов молочнокислых микроорганизмов рядом с рисунком.

4. Сравните исследованные культуры и сформулируйте выводы.

- 5*(Задание повышенной сложности). Исследуйте антагонистическую активность выделенных культур молочнокислых бактерий чашечным методом лунок.

Аппаратура, оборудование и материалы:

Аппаратура и оборудование: титровальная установка; счетчик колоний; на 1 рабочее место: микроскоп, штатив с бактериологической петлей, бактериологической иглой, пинцет, набор красителей и иммерсионное масло, спиртовка.

Реактивы и материалы – чистые культуры молочнокислых кокков (в колбах и пробирках с обезжиренным молоком, в чашках Петри в виде колоний на АГМ, АГМ с цитратом); обезжиренное молоко (по 200 см³ на каждый вид закваски), питательные среды АГМ и АГМ с цитратом, спички, 1 н раствор NaOH, 1 % спиртовой раствор фенолфталеина.

Посуда – предметные стекла, пробирки стеклянные вместимостью 10 см³ (по 1 шт. на каждый вид микроорганизма); чашки Петри, пипетки стеклянные на 10 см³ (по 1 шт. на каждое рабочее место), колбы конические вместимостью на 250 см³ (по 1 шт. на каждый вид закваски); химические стаканы вместимостью 100 см³ (по 1 шт. на каждое рабочее место).

Содержание отчета, форма и правила оформления отчета о выполненной работе

Отчет по лабораторной работе оформляется в специальной тетради и содержит: дату, название, цель работы, зарисовки препаратов, просмотренных под микроскопом, со всеми необходимыми подписями (название культуры, тип препарата, краситель, описание морфологии клеток, описание колоний на плотных питательных средах, характера и кислотности сгустка в обезжиренном молоке, характеристика основных биохимических свойств культуры – тип брожения, предельная кислотность, энергия кислотообразования, применение в молочной отрасли); методы определения молочнокислых микроорганизмов; выводы по работе. При оформлении работы сокращения не допускаются!

Контрольные вопросы и защита работы

1. Этапы выделения чистых культур заквасочной микрофлоры
2. Методы выделения чистых культур
3. Классификация и общие свойства молочнокислых кокков.
4. Характеристика молочнокислых кокков.
5. Характеристика молочнокислых палочек
6. Применение молочнокислых микроорганизмов в пищевой промышленности.

Лабораторная работа № 3 Исследование пробиотической микрофлоры

Цель занятия: исследовать морфологические и биохимические свойства пробиотиков – бифидобактерий, пропионовокислых бактерий и лактобацилл, применяющихся в пищевой промышленности.

Теоретические положения

Бифидобактерии по современной номенклатуре относятся к семейству *Bifidobacteriaceae*, роду *Bifidobacterium* (от лат. *bifidus* – раздвоенный). В настоящее время идентифицировано 24 вида бифидобактерий. Наиболее изученные виды: *B.bifidum* (типовой), *B.adolescentis*, *B.longum*, *B.breve*, *B.infantis*. По морфологии это чрезвычайно вариабельные по форме палочки – прямые, изогнутые, разветвленные, Y и V – образной, булавововидной и лопатовидной формы. Грам+, не образуют спор и капсул, неподвижные. Строгие анаэробы, но некоторые виды могут развиваться в присутствии небольших количеств кислорода. Оптимальная температура (36 ÷ 38) °С (минимум 20 °С, максимум 50 °С), оптимальный уровень pH = 6 – 7 (при pH меньше 5,5 рост прекращается).

Бифидобактерии сбраживают углеводы с образованием уксусной и молочной кислоты в соотношении 3 : 2, молоко сквашивают через 4 и более суток, при внесении ростовых веществ – через 24 – 36 ч, K = 120 – 130 °Т. Для культивирования требуют большого количества ростовых веществ (дрожжевого автолизата, витаминов, моно- и олигосахаридов, цистеина и др. Элективные среды – Блаурока (печеночно-цистеиновая), кукурузно-гидролизатная (ГМК).

Бифидобактерии – это представители нормальной (эубиотической) микрофлоры человека, защищают кишечник от гнилостной и патогенной микрофлоры, также осуществляют синтез витаминов, аминокислот, бактерицидных веществ; относятся к группе пробиотиков.

Определение количества бифидобактерий основано на их способности размножаться в анаэробных условиях в плотных и полужидких питательных средах при температуре (37 ± 1) °С с образованием типичных колоний. Перед проведением анализа элективную среду, разлитую высоким столбиком, нагревают в кипящей водяной бане до полного расплавления агара и выдерживают в кипящей водяной бане в течение (25 ± 5) мин для снижения в ней растворенного кислорода.

При определении бифидобактерий в смешанных с молочнокислыми бактериями культурах перед расплавлением в среду вносят стерильный раствор неомицина или

диклосациллина. После расплавления среды пробирки охлаждают в водяной бане до температуры (45 ± 2) °C.

Готовят разведения продукта или бакконцентрата с 1 по 9. Затем из трех-четырех последних разведений берут пипеткой по 1 см³ и вносят в пробирки со средой. Пипетка с отобранным разведением опускается на дно пробирки, а затем медленно поднимается вращательным движением, таким образом, чтобы тщательно перемешать разведение со средой, не допустить попадания воздуха и ограничить пристеночный рост. Проводят два параллельных определения.

Посевы выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1) °C в течение 2 – 3 сут, в случае определения бифидобактерий в смешанных с молочнокислыми бактериями культурах – 3 – 5 сут. По окончании инкубирования учитывают последние пробирки, в которых выросли типичные для бифидобактерий колонии: в плотных средах – в виде крупных «дисков» или «гречишных зерен», в полужидких средах – в виде «гвоздиков», «вытянутых веретен», иногда в виде «полос», расположенных вдоль пробирки. Отмечают разведение и подсчитывают количество выросших колоний. Затем проводят пересчет на 1 см³ (г) продукта и рассчитывают среднее по нескольким разведениям.

Подтверждение принадлежности образовавшихся типичных колоний к бифидобактериям проводят методом микроскопирования. Из типичных колоний последнего разведения готовят мазки, окрашенные метиленовым голубым. При приготовлении микропрепарата на чистое предметное стекло наносят петлей небольшую каплю стерильной воды или физраствора и исследуемый материал, взятый с колонии. Материал тщательно размешивают и распределяют на площади около 1 см². Препарат высушивают при комнатной температуре, фиксируют в пламени горелки и красят метиленовым голубым. Бифидобактерии в препаратах имеют вид тонких, мелкозернистых, слегка изогнутых палочек с утолщениями на концах или без них; располагаются группами, в виде римских пятерок (V), скоплениями в виде китайских иероглифов, и могут образовывать короткие цепочки.

Пропионовокислые бактерии, использующиеся в сыроделии, относятся к семейству *Propionibacteriaceae*, роду *Propionibacterium*. Применяются виды: *P. shermanii*, *P. freudenreichii* (при производстве твердых сыров с длительными сроками созревания). Мелкие, неподвижные, не образующие спор и капсул, грам+ полиморфные палочки, факультативные анаэробы, сбраживают молочную кислоту в уксусную, пропионовую кислоты и CO₂, вырабатывают витамин B₁₂, участвуют в формировании вкуса и рисунка сыров (крупные глазки). В молоке развиваются медленно, ЭК = 5 – 7 дней, К = 160 – 170.

Определение пропионовокислых бактерий основано на подсчете колоний пропионовокислых бактерий, вырастающих в высоком столбике элективной плотной питательной среды при (30 ± 1) °C в течение 5 – 7 сут. По окончании инкубирования учитывают последние пробирки, в которых выросли типичные для пропионовокислых бактерий колонии – в виде крупных «дисков» или «гречишных зерен» обычно светло-кремового цвета. Колонии могут быть белыми, серыми, розовыми, красными, желтыми или оранжевыми. Отмечают разведение и подсчитывают количество выросших колоний.

Подтверждение принадлежности образовавшихся типичных колоний к пропионовокислым бактериям проводят методом микроскопирования и пробой на каталазу. Пропионовокислые бактерии в препаратах имеют вид дифтероидных или булавовидных палочек с одним округленным концом, другой конец может быть конусообразным или заостренным, окрашивающимся менее интенсивно. Клетки некоторых культур могут быть кокковидными, удлинёнными, раздвоенными и даже разветвленными. Клетки обычно располагаются поодиночке, парами, в виде букв V и Y, короткими цепочками или группами в виде «китайских иероглифов».

Пропионовокислые бактерии являются каталазоположительными. Определение каталазной активности микроорганизмов, выросших на плотных питательных средах, проводят следующим образом. На колонию микроорганизмов, взятую с поверхности питательной среды или извлеченную из нее и помещенную на предметное стекло, после выдержки на воздухе в течение 30 мин пипеткой наносят каплю 3 % раствора перекиси водорода. При появлении на стекле пузырьков газа через 30 – 60 с считают, что они

образовались в результате разложения перекиси водорода каталазой, образуемой микроорганизмами.

Задания и порядок выполнения работы (форма проведения работы - заседание научной лаборатории)

1. Проведите анализ литературы по методичке, рекомендуемым источникам и научным журналам по вопросам: свойства, применение и методы определения молочнокислых палочек вида (задание выполняется заранее по вариантам):

- *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*;
- *Lb. acidophilus*;
- *Lb. helveticus*;
- *Lb. plantarum*;
- *Lb. casei subsp casei*;
- *Lb. casei subsp rhamnosus*,

2. Постановка проблемы: в научную лабораторию поступили несколько многокомпонентных смесей молочнокислых микроорганизмов зарубежного производства, предназначенных для пищевых продуктов, о которых известно следующее:

- смесь № 1 предназначена для пробиотических продуктов и содержит ацидофильную палочку и палочку рамнозус;
- смесь № 2 предназначена для получения йогурта;
- смесь № 3 предназначена для получения сыра типа швейцарского (с предупреждением порока позднего вспучивания).

Необходимо определить состав микрофлоры данных смесей.

3. Зная свойства молочнокислых микроорганизмов и методы их определения, изученные в предыдущей работе, обсудите проблему и пути ее решения (метод мозговой атаки) и составьте план экспериментов, которые позволят выполнить поставленную задачу. Особое внимание обратите на разницу оптимальных температур развития, предельной кислотности и морфологических свойств культур, входящих в состав смесей.

4. Проведите необходимые разведения и посевы, инкубируйте их.

5. Исследуйте морфологические, культуральные и биохимические свойства полученных чистых культур молочнокислых палочек по заданию преподавателя в следующей последовательности:

- опишите размер, форму и цвет колоний микроорганизмов на элективных плотных питательных средах (АГМ, MRS);

- опишите особенности роста культур в жидких питательных средах, в частности, в обезжиренном молоке, отметив характер и консистенцию сгустка, определите его кислотность;

- приготовьте фиксированные препараты культур, окрасьте их метиленовой синью, рассмотрите под микроскопом в нескольких полях зрения и зарисуйте наиболее характерные виды, обратив внимание на форму, размер и взаимное расположение клеток;

- приготовьте из культур препараты «раздавленная капля», рассмотрите под микроскопом, зарисуйте, сделайте вывод о форме и подвижности клеток.

6. Кратко опишите основные свойства изученных видов молочнокислых микроорганизмов рядом с рисунком.

7. Проведите количественный учет разных видов молочнокислых микроорганизмов методом НВЧ и счета колоний на плотных питательных средах.

7. Сравните исследованные культуры и сформулируйте выводы о составе смесей.

Аппаратура, оборудование и материалы:

Аппаратура и оборудование: титровальная установка, счетчик колоний, микроскопы, штативы с бактериологической петлей, бактериологической иглой, пинцет, набор красителей и иммерсионное масло, спиртовка.

Реактивы и материалы – чистые культуры молочнокислых палочек (в колбах и пробирках с обезжиренным молоком, колонии на АГМ и MRS); обезжиренное молоко (по

200 см³ на каждый вид закваски), питательные среды АГМ, MRS, спички, 1 н раствор NaOH, 1 % спиртовой раствор фенолфталеина.

Посуда – предметные стекла, пробирки стеклянные вместимостью 10 см³ (по 1 шт. на каждый вид микроорганизма); чашки Петри, пипетки стеклянные на 10 см³ (по 1 шт. на каждое рабочее место), колбы конические вместимостью на 250 см³ (по 1 шт. на каждый вид закваски); химические стаканы вместимостью 100 см³ (по 1 шт. на каждое рабочее место).

Содержание отчета, форма и правила оформления отчета о выполненной работе

Отчет по лабораторной работе оформляется в специальной тетради и содержит: дату, название, цель работы, описание эксперимента, схемы посевов, зарисовки препаратов, просмотренных под микроскопом, со всеми необходимыми подписями (название культуры, тип препарата, краситель, описание морфологии клеток, описание колоний на плотных питательных средах, характера и кислотности сгустка в обезжиренном молоке, характеристика основных биохимических свойств культуры – тип брожения, предельная кислотность, энергия кислотообразования, применение в молочной отрасли); выводы по работе.

Контрольные вопросы и защита работы

1. Определение и классификация пробиотиков.
2. Физиологические свойства пробиотиков
3. Применение пробиотиков в производстве пищевых продуктов
4. Определение и классификация пребиотиков
5. Применение пребиотиков в пищевой промышленности
6. Определение и классификация синбиотиков.

Лабораторная работа № 4

Приготовление и исследование качества заквасок прямого внесения

Цель работы: изучить этапы приготовления и требования к качеству разных видов заквасок, освоить методики их микробиологического исследования.

Теоретические положения

Закваски – это культуры микроорганизмов, которые используют при изготовлении пищевых продуктов (пищевых напитков, творога, сметаны, сыров, кисломолочного масла).

Закваски могут включать культуры одного вида (одноштабные, многоштабные), а также смешанные культуры разных видов, т.е. их комбинации. В молочной промышленности чаще всего используют смешанные культуры, включающие активные кислотообразователи (молочный и сливочный лактококки) и ароматообразующие микроорганизмы (биовариант, образующий диацетил, лейконостоки); в йогуртах – смешанные культуры (термофильный стрептококк и болгарская палочка).

По форме (консистенции) закваски бывают жидкие, замороженные, сухие. По концентрации клеток: обычные (10⁶-10⁹ кл/г), бакконцентраты и бакпрепараты сухие или замороженные (10⁸-10¹⁰ кл/г) для приготовления закваски беспересадочным способом, используются после активизации; закваски прямого внесения (10¹¹ – 10¹² кл/г), для непосредственного внесения в нормализованную смесь.

Молоко, используемое для получения заквасок, должно быть высокого качества по всем показателям, ингибиторы должны отсутствовать. Предпочтительно использовать не цельное, а обезжиренное молоко. Тепловая обработка молока проводится путем стерилизации (для лабораторной закваски, при 121°C 10-30 мин в зависимости от емкости тары, проверяют на стерильность путем термостатирования при 37°C 3 суток) или пастеризации (90-95°C 20-30 мин). Для проверки эффективности пастеризации асептически отбирают 10-20 мл молока и термостатируют его при 40-45°C 24-48 ч, после чего оценивают характер сгустка и микроскопируют препарат:

- если сгусток плотный, ровный, под микроскопом – кокки, то температура пастеризации была менее 90°C;
- если сгусток дряблый, зернистые палочки – не выдержано время пастеризации;

- если сгустка нет, произошла пептонизация казеина, в мазке спорообразующие палочки – пастеризация проведена правильно.

После тепловой обработки молоко охлаждают до температуры заквашивания. Флаконы с заквасками вскрывают с соблюдением правил стерильности непосредственно перед употреблением и полностью используют, соблюдают сроки хранения. Бакконцентраты и сухие закваски растворяют в стерильном молоке или физрастворе, активизируют – вносят в 1 л пастеризованного молока и термостатируют 2-3 ч. Кефирные грибки восстанавливают, вносят в пастеризованное ОМ 1:40 на 20-24 ч, готовят грибковую закваску, отделяют ее от грибов, готовят производственную закваску, 3-5% вносят в нормализованную смесь.

Контроль качества заквасок

Требования к микробиологическим показателям заквасок нормируются СанПиНами. В соответствии с СанПиНом 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов»:

- в заквасках для кефира симбиотических жидких БГКП должны отсутствовать в 3 мл, *S. aureus* в 10 мл, патогенные, в том числе сальмонеллы – в 100 мл, плесени не более 5 КОЕ/г;

- в жидких заквасках из чистых культур для производства пищевых продуктов, кисломолочного масла и сыров общее количество молочнокислых микроорганизмов (ОКММ) – не менее $1 \cdot 10^8$ КОЕ/г, БГКП не допускаются в 10 мл, *S. aureus* в 10 мл, патогенные, в том числе сальмонеллы – в 100 мл, плесени и дрожжи не более 5 КОЕ/г;

- в сухих заквасках ОКММ – не менее $1 \cdot 10^9$ КОЕ/г, БГКП не допускаются в 1 г, *S. aureus* в 1 г, патогенные, в том числе сальмонеллы – в 10 г, плесени и дрожжи не более 5 КОЕ/г.

Лабораторная и производственная закваски на стерилизованном молоке проверяются на активность (предельная кислотность и продолжительность свертывания молока) и на постороннюю микрофлору (препарат, просмотр не менее 10 полей зрения). Производственная закваска на пастеризованном молоке контролируется по активности, по микроскопическому препарату, кислотности, БГКП и органолептике.

Кефирную закваску контролируют по кислотности, БГКП и препарату, при возникновении пороков продукта проводится дополнительное исследование на соотношение микрофлоры. Состав микрофлоры смешанных заквасок контролируется методом предельных разведений.

Закваски анализируют на продуцирование ароматообразующих веществ по креатиновой пробе (розовое окрашивание с КОН и креатином), на наличие CO_2 – нагреванием закваски в пробирке до 90°C. Отмечают уровень, при наличии CO_2 обнаруживается подъем сгустка на 0,6-5 см.

При подозрении на бактериофаг проводят условный тест: посев на стерильное ОМ с метиленовым синим, если после обесцвечивания через 4-5 ч вновь наблюдается посинение, вероятно развитие бактериофага.

Контроль сухих заквасок включает осмотр упаковки, определение количества живых клеток и их активности, наличия посторонней микрофлоры, в т.ч. дрожжей и плесеней, определение влажности (должна быть менее 10%).

Аппаратура и материалы: образцы заквасок разных видов, молоко стерилизованное и пастеризованное, спиртовки, материалы для приготовления фиксированных препаратов с простой окраской, микроскопы, титровальные установки.

Методика и порядок выполнения работы:

1. Ознакомьтесь с разными видами заквасок. Обратите внимание на условные обозначения, принятые для отечественных и зарубежных заквасок разных составов, маркировку, характеристику и нормативные требования к качественным показателям.

2. Изучите требования к молоку для приготовления заквасок. Исследуйте образцы молока на эффективность пастеризации, оформите результаты, полученные в подгруппе, и сделайте вывод.

3. Приготовьте лабораторную или производственную закваски по заданию преподавателя, оцените и сравните их активность и качество по всем показателям. Оформите результаты в тетради, сделайте вывод.

Содержание отчета и его форма: результаты определения эффективности пастеризации образцов молока; описание состава и свойств исследуемых заквасок; результаты исследования активности и качества заквасок.

Контрольные вопросы и защита работы

1. Факторы, учитываемые при подборе культур для заквасок.
2. Этапы выделения чистых культур молочнокислых микроорганизмов.
3. Схема выделения чистых культур мезофильных молочнокислых лактококков.
4. Схема выделения чистых культур термофильных стрептококков.
5. Классификация заквасок.
6. Преимущества и перспективы использования заквасок прямого внесения.
7. Общие правила работы с заквасками на предприятии.
8. Этапы приготовления заквасок на предприятии.
9. Микробиологический контроль качества заквасок. Пороки заквасок.
10. Современные способы совершенствования качества заквасок.

Лабораторная работа № 5

Исследование свойств возбудителей микробиологической порчи пищевых продуктов

Цель занятия: ознакомиться с морфологией микроорганизмов, вызывающих порчу пищевых продуктов.

Теоретические положения

Так называемые «дикие» дрожжи, вызывающие порчу пищевых продуктов и напитков, часто проявляют высокую специфичность к субстрату и могут размножаться в среде с высоким содержанием сахара, соли, спирта (например, в пиве, винах, фруктовых соках, джемах, салатных заправках, соусах, пресервах и др). Наиболее характерным признаком порчи продуктов при развитии является вздутие упаковки под действием образующегося диоксида углерода дрожжей в результате сбраживания сахаров. Размножение дрожжей в пищевых продуктах может приводить и к другим типам порчи – образованию мути и (или) пленки, появлению неприятного дрожжевого запаха и привкуса, вспучиванию.

Чаще всего среди «диких» встречаются дрожжи родов *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Torulopsis*, *Torulasporea*, *Pichia*, *Hansenula*, *Brettanomyces*, *Rhodotorula* и др. Дрожжи рода *Saccharomyces* могут обитать в самых разных средах, но в основном они размножаются в пищевых продуктах и напитках, содержащих некоторое количество сахара. Наиболее часто из пищевых продуктов выделяются виды *S. cerevisiae* и *S. bayanus*.

Представители рода *Saccharomyces*, способные вызывать порчу пищевых продуктов, приведены в табл. 3.2.

Таблица 3.2 -Виды *Saccharomyces*, вызывающие порчу пищевых продуктов и напитков

Группа продуктов	Виды <i>Saccharomyces</i>
Фрукты, фруктовые концентраты, соки Овощные салаты	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. bayanus</i> , <i>S. pastorianus</i> , <i>S. kluyveri</i> , <i>S. unisporus</i> , <i>S. exiguus</i> <i>S. exiguus</i> , <i>S. dairenensis</i> , <i>S. bayanus</i> , <i>S. unisporus</i>
Молочные продукты	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. dairenensis</i> , <i>S. exiguus</i> , <i>S. kluyver</i>
Мясные продукты	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. exiguus</i>

Хлебобулочные изделия	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. exiguus</i> , <i>S. unisporus</i> , <i>S. bayanus</i>
Продукты с высоким содержанием сахара	<i>S. cerevisiae</i>
Алкобольные напитки	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. bayanus</i> , <i>S. pastorianus</i>

Дрожжи рода *Zygosacchomyces* растут в пищевых продуктах с высокой концентрацией сахара или с низким значением активности воды. Наиболее осмофильными и ксеротолерантными видами считаются *Z. rouxii*, *Z. bailii*, *Z. bisporus*. Они вызывают брожение меда, сиропов, мелассы, ферментативную порчу шоколадной начинки кондитерских изделий, размножаются в сушеных продуктах, макаронных и хлебобулочных изделиях.

Дрожжи рода *Brettanomyces* наиболее часто вызывают порчу вина, пива, безалкогольных и чайных напитков. Наибольшее распространение получили виды *B. bruxellensis*, *B. anomalis*, *B. intermedius*, *B. custersianus*. Дрожжи этих родов выделяются также из различных типов сыров и пищевых напитков – кефира, йогурта.

Дрожжи рода *Candida* вызывают такие типы порчи, как газообразование, появление мути, осадка и поверхностной пленки, иногда изменение текстуры и обесцвечивания продукта. Характер порчи определяется типами пищевых продуктов. На фруктах обычно выявляются *C. pulcherrina*, *C. famata*, *C. membranifaciens*; в мясных продуктах преобладает *C. famata*; в пищевых – *C. kefir*, *C. sphaerica*, *C. famata*, *C. lipolytica* и *Geotrichum candidum*.

Представители дрожжей рода *Candida* (*C. mycoderma*, *C. utilis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*) вызывают помутнение пива, придают ему неприятные вкус и запах. На поверхности сула и пива часто образуют плотную белую или сероватую сухую пленку.

Дрожжи рода *Torulopsis* (*T. colliculosa*, *T. inconspicula*) ухудшают вкус пива, вызывают его помутнение, не отделяются при фильтрации. Пивные торулы отмирают и автолизуются раньше культурных дрожжей, что благоприятствует развитию педиококков. Дрожжи этого рода часто содержатся в засевных дрожжах, на зеленом солоде, в воздухе.

Порча пищевых продуктов – это любое их изменение, неприемлемое для потребления человеком. Такие изменения могут быть следствием микробиологических (биохимических) и/или физико-химических процессов. Развитие нежелательной микрофлоры, особенно способной к выделению внеклеточных ферментов, расщепляющих углеводы, белки и жиры, является главной причиной потери примерно трети производимой в мире пищевой продукции, и это является серьезной экономической проблемой.

Контаминация продуктов разными видами микроорганизмов и их развитие могут происходить на всех стадиях производства – от получения сырья до фасовки и хранения готовой продукции. Нежелательные изменения продуктов могут быть явно заметными – образование слизи, изменение внешнего вида, запаха, цвета и консистенции, но могут проявляться уже при непосредственном употреблении (изменение вкуса). Потребитель отказывается покупать такие продукты, потому что их свойства не соответствуют его ожиданиям.

Моделирование микробиологической порчи пищевых продуктов – относительно новый подход к обеспечению их качества и безопасности, в основе которого лежит предположение о том, что процессы развития микроорганизмов определенного вида в определенном продукте при определенных условиях можно воспроизвести, описать математически и предсказать (интерполировать) для других условий. Это альтернатива длительным и дорогостоящим испытаниям срока годности.

В последние годы, в том числе в результате реализации международных проектов, были разработаны компьютеризированные базы данных для моделей порчи:

разных групп продуктов (напитков, рыбы, морепродуктов)

вызванной различными микроорганизмами, в т.ч. *Bacillus* spp., *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, энтеробактерий (включая *Escherichia coli*), дрожжей;

вызванной различными ферментами (липазами и протеазами), продуцируемыми микроорганизмами.

Термин «прогностическая микробиология» появился в 1980-х, когда были получены первые математические модели, описывающие рост микроорганизмов в пищевых продуктах. В настоящее время созданы пакеты прикладных программ, например, FoodMicromodel (Великобритания) и Pathogen Modelling Programme (США), позволяющие моделировать процессы размножения пищевых патогенов и микроорганизмов порчи. Интересно, что для многих процессов порчи было открыто сходство реакций на температуру и введено понятие «универсальная кривая порчи» для общего микробного числа, результатов химического и органолептического анализа.

Для точного прогнозирования процессов порчи необходимо учитывать не только внутренние (рН, активность воды, редокс-потенциал, состав и структура продукта, особенно наличие бактерицидных веществ) и внешние (температура, относительная влажность, наличие кислорода и т.д.) факторы, но и разнообразие вызывающих ее микроорганизмов, что является сложной задачей и требует применения методов многофакторного анализа.

Цель моделирования – свести биологические (биохимические) явления к системе математических уравнений с возможностью анализа большого числа разных факторов.

Выделяют пять типов моделей, которые описывают различные аспекты развития микроорганизмов в пищевых продуктах:

- модели начала роста; разработаны для определения времени, которое необходимо определенной группе микробов для адаптации к среде, инициации развития в пищевом продукте, и особенно синтезу экзоферментов и токсинов;
- вероятностные модели типа «рост-отсутствие роста»; созданы для определения граничных условий среды, допускающих рост микроорганизмов;
- кинетические модели роста; дают возможность прогнозировать длительность всех фаз развития данных микроорганизмов, скорость роста, уровень численности при определенных условиях;
- модели типа «инактивация – гибель» при тепловой обработке или другом виде физического воздействия (излучении, высоком давлении, СВЧ и т.д.); для определения вероятного снижения численности микроорганизмов при различных параметрах технологических процессов;
- модели выживания; дают возможность оценить способность данных микроорганизмов сохранять жизнеспособность в пищевом продукте с определенным уровнем рН, активности воды и т.д.; особенно важны для изучения патогенных микробов с низкой инфицирующей дозой.

В зависимости от глубины исследования процессов различают модели первого порядка, которые описывают изменения в популяции микроорганизмов со временем, второго порядка – зависимость модели первого порядка от условий окружающей среды; третьего порядка – преобразование данных моделей первого и второго порядка в удобный для пользователя вид с помощью средств компьютерной обработки.

Различают также общие и специфические модели. Общие получают с использованием специально подготовленных стерильных питательных сред, при этом отсутствует конкуренция со стороны других микроорганизмов и не учтено влияние структуры пищевого продукта. Для получения специфических моделей пищевой продукт модифицируют, меняя его рН, влажность, концентрацию консерванта и т.п., и затем культивируют исследуемые микроорганизмы при различных температурах.

В общем виде разработка моделей порчи включает следующие этапы.

Планирование (проводится анализ состояния вопроса, определяются цель работы, ее последовательность, тип модели, методы и аппаратура, необходимые для исследований). На первом этапе проводится анализ данного продукта для определения:

- метаболитов и биохимических реакций, вызывающих порчу;
- микроорганизмов, ответственных за реакции;
- диапазона условий окружающей среды, при которых происходит порча.

Получение и анализ данных. Большую роль играют способы проведения эксперимента, подбор штаммов микроорганизмов и количества инокулята, моделируемых параметров роста. Разработка структуры модели (аррениусовского типа, линейные, квадратичные, полиномиальные, на основе искусственных нейронных сетей, обладающих способностью к итеративному самообучению)

Валидация (валидизация), верификация и поддержание работоспособности модели. Валидация – оценка успешности, пригодности модели, сравнение прогнозируемых данных модели с реальными наблюдаемыми данными порчи. Верификация — обычно внутренний процесс управления качеством, обеспечивающий согласие с правилами, стандартами или спецификацией. Валидация подтверждает, что «вы создали правильный продукт», а верификация подтверждает, что «вы создали продукт таким, каким и намеревались его сделать»

Для верификации конкретной модели проводят «провокационное тестирование». Для оценки работоспособности модели применяются статистические методы, которые позволяют рассчитать множественную корреляцию R^2 как меру точности, среднеквадратичную ошибку, стандартное отклонение, коэффициенты смещения и точности.

Прогностические модели порчи могут использоваться как для предотвращения возможных проблем, так и для разрешения возникших проблем. Опубликованы работы по моделированию поведения разных микроорганизмов в молочных продуктах, в т.ч. *S. aureus*, *B. cereus*, *Aeromonas hydrophila*.

Основные направления применения прогностических моделей порчи:

- разработка рецептур и способов получения новых (модифицированных) пищевых продуктов;
- определение срока годности;
- системы и программы оценки микробиологических рисков алиментарных заболеваний, разработка нормативной документации;
- обучение и профессиональная подготовка (использование готовых моделей и разработка собственных).

Моделирование имеет определенные границы, которые связаны с комплексностью проблем порчи (влияние большого количества факторов); структурой продукта (отличается от питательных сред); взаимным влиянием микроорганизмов.

Пример: при разработке общих моделей микробиологической порчи для скоропортящихся продуктов выделили шесть групп микроорганизмов порчи (псевдомонады, дрожжи, энтеробактерии и др.); смеси из разных штаммов инокулировались в жидкую питательную среду с pH и a_w , близкими к значениям в пищевых продуктах; инкубация проводилась при температурах от 2 до 20°C в течение 6 недель; начальная концентрация инокулята составляла 10³ КОЕ/мл; определяли общую численность микроорганизмов (для измерения могут быть использованы методы счета колоний, НВЧ, по оптической плотности, измерение импеданса и биолюминесценции), активность липаз и протеаз (по снижению концентрации субстрата, по увеличению продуктов расщепления, метод диффузии на агаре, рефрактометрический; при этом не наблюдается прямой зависимости между концентрацией ферментов количеством клеток), концентрацию CO₂, органических метаболитов, особенно влияющих на появление посторонних вкусов и запахов (применяются хроматографические методы – ТСХ, ГЖХ, ВЭЖХ, а также инфракрасная спектроскопия).

Разработка прогностических моделей следующего поколения будет направлена на:

- моделирование лаг-фазы с целью ее продления;
- обобщение последствий взаимного влияния микроорганизмов в пищевых продуктах, особенно описание ингибирующего действия молочнокислых микроорганизмов;
- моделирование поведения микроорганизмов при термической инактивации (в т.ч. стерилизации), новых методах консервирования и упаковки;
- прогнозирование активности микроорганизмов в фазе гибели;
- разработку моделей с применением молекулярной биологии и генной инженерии.

Аппаратура и материалы: чистые культуры микроорганизмов, вызывающих пороки пищевых продуктов, на плотных и жидких питательных средах; материалы для приготовления и окраски фиксированных мазков (предметные стекла, красители, спиртовки, бактериологические петли и др.); микроскопы.

Методика и порядок выполнения работы

1. Исследуйте морфологические и культуральные свойства следующих микроорганизмов, вызывающих наиболее распространенные пороки пищевых продуктов.

1.1. Спорообразующие палочки (описание колоний на МПА и молочном агаре, просмотр фиксированных препаратов с простой окраской, окраской по Граму, на выявление спор, препараты «раздавленная капля»):

- *Bacillus subtilis* – сенная палочка;
- *B. mesentericus* – картофельная палочка;
- *B. mycoides* – грибовидная палочка;
- *Clostridium butiricum* – возбудитель маслянокислого брожения (дополнительно – окраска раствором Люголя на выявление гранулезы).

1.2. Неспорообразующие микроорганизмы (описание колоний на плотных питательных средах, фиксированные препараты с простой окраской, окраской по Граму, препараты «раздавленная капля»):

- *Pseudomonas fluorescens* (флюоресцирующая палочка);
- *Ps. aeruginosa* (синегнойная палочка);
- *Escherichia coli* (кишечная палочка);
- *Proteus vulgaris* (палочка протей);
- *Serratia marcescens* (чудесная палочка);
- *Enterococcus liquefaciens* (термостойкий энтерококк);
- термоустойчивая молочнокислая палочка, вызывающая порок перекисания.

1.3. Плесени (описание колоний на плотных питательных средах, раздавленная капля):

- *Geothrichum lactis* (старое название *Oidium lactis* – молочная плесень);
- *Penicillium notatum* (или другие виды пенициллиновых плесеней);
- *Aspergillus niger* (или другие виды аспергилловых плесеней);
- *Mucor*;
- *Alternaria*;
- *Catenularia*;
- *Cladosporium*.

1.4. Дрожжи (описание особенностей роста на плотных или жидких питательных средах, препараты «висячая капля», фиксированные препараты с простой окраской):

- дикие (фруктовые);
- *Rhodotorula* (пигментообразующие);
- *Mycoderma*.

1.5. Бактериофаги (изучить и зарисовать особенности морфологии по альбомам).

2. Оформите результаты работы в тетради.

3*(задание повышенной сложности). Разработайте модель микробной порчи продукта по заданию преподавателя.

Содержание отчета и его форма: название и цель работы, зарисовки препаратов со всеми необходимыми данными о свойствах изученных микроорганизмов, методы предупреждения развития нежелательной микрофлоры.

Контрольные вопросы и защита работы

1. Общая характеристика и особенности развития посторонней микрофлоры в молоке.
2. Характеристика спорообразующих гнилостных и маслянокислых микроорганизмов.
3. Характеристика бесспоровых гнилостных микроорганизмов.
4. Термоустойчивые микроорганизмы, выдерживающие режимы пастеризации: маммококки и молочнокислая палочка, вызывающая порок перекисания.

5. Плесени и дрожжи, вызывающие пороки молока и пищевых продуктов.
6. Бактериофаги как возбудители пороков пищевых продуктов. Методы предупреждения бактериофагии.
7. Актуальность моделирования микробиологической порчи и безопасности пищевых продуктов
8. Классификация и этапы разработки моделей микробиологической порчи пищевых продуктов
9. Применение моделей микробиологической порчи

Лабораторная работа № 6

Исследование свойств патогенных микроорганизмов, вызывающих алиментарные заболевания

Цель занятия: ознакомиться с морфологией и культуральными признаками возбудителей алиментарных заболеваний.

Теоретические положения

При гигиенической оценке пищевых продуктов основным требованием является отсутствие в них патогенных микроорганизмов или токсических метаболитов. Для возникновения инфекционного процесса достаточно, чтобы в пищевом продукте имелось небольшое количество возбудителей, которые после попадания в организм человека размножаются в нем и вызывают соответствующее заболевание.

Различают зооантропонозные и антропонозные инфекционные заболевания. Зооантропонозными называют заболевания, общие для человека и животных. К ним относятся туберкулез, бруцеллез, сибирская язва, лептоспироз и др.

К антропонозным заболеваниям, передающимся через пищевые продукты, относятся дизентерия, холера, брюшной тиф и паратиф.

Туберкулез. Возбудитель туберкулеза относится к роду *Mycobacterium*, семейства *Mycobacteriaceae*, порядок *Actinomycetales*. Различают три вида возбудителей: человеческий – *Mycobacterium tuberculosis*, бычий – *M. bovis*, а также *M. africanus*.

М о р ф о л о г и я. Микобактерии туберкулеза – тонкие, прямые или слегка изогнутые палочки размером $(0,3-0,6) \times (1,0-4,0)$ мкм, иногда имеют на концах вздутия. В культурах встречаются зернистые формы, ветвящиеся, шаровидные. Микроб положительно окрашивается по Граму, неподвижен, спор и капсул не образует. Принадлежит к группе кислотоустойчивых бактерий, так как содержит большое количество липидов (миколовую кислоту и воскоподобные вещества).

К у л ь т и в и р о в а н и е. Возбудитель туберкулеза строгий аэроб. Температурный оптимум 37–38 °С, может расти в диапазоне температур 30–42 °С. Оптимальное значение рН 6,4–7,2. Отличительной особенностью культивирования микробактерий является их медленный рост. Это объясняется тем, что время генерации *Mycobacterium tuberculosis* составляет 20 ч (для сравнения время генерации кишечной палочки 20 мин). На простых питательных средах микобактерии растут плохо, поэтому элективные среды имеют сложный состав: в них включают витамины, яичный желток, глицерин и др. На поверхности МПБ с 4–5 % глицерина микобактерии растут в виде нежной пленки, которая постепенно утолщается, становится ломкой и приобретает бугристо-морщинистый вид, бульон при этом остается прозрачным. На МПА с глицерином (2–3 %) рост микобактерий появляется к концу второй недели в виде сухого налета на поверхности.

Бруцеллез. Возбудителями бруцеллеза являются бактерии, называемые бруцеллами. Различают три типа бруцелл: *B. melitensis* – вызывает заболевание овец и коз, очень

патогенна для человека; *B. Abortus* – вызывает заболевание у крупного рогатого скота, патогенна для человека; *B. suis* – возбудитель бруцеллеза у свиней.

М о р ф о л о г и я. Бруцеллы представляют собой очень мелкие, коккоподобные палочки размером $(0,3-0,7) \times (0,6-1,5)$ мкм, грамотрицательные, неподвижные, спор не образуют. Свежевыделенные штаммы могут образовывать нежную капсулу.

К у л ь т и в и р о в а н и е. Облигатные аэробы. Оптимальная температура роста 36–37 °С; pH среды 6,6–7,4. Бруцеллы лучше растут на средах с добавлением печени, крови, сыворотки. На мясопептонном печеночном агаре бруцеллы растут на поверхности среды в виде капель росы, блестящих, гладких, круглых, с перламутровым блеском. Биохимическая активность бруцелл довольно низкая; они не свертывают молоко, не разжижают желатин, не расщепляют углеводы.

Сибирская язва – острая, особо опасная инфекция (ООИ) – болезнь всех видов сельскохозяйственных и многих диких видов животных, к ней восприимчив и человек.

М о р ф о л о г и я. Возбудитель заболевания – *Bacillus anthracis* (от лат *anthracis* – антрацит, черный уголь) представляет собой крупные прямые палочки размерами $(1,0-1,5) \times (10-15)$ мкм. Палочки грамположительны, неподвижны, образуют эндоспоры, располагающиеся центрально. В мазках из органов и тканей клетки располагаются одиночно, попарно или в виде коротких цепочек, окруженных капсулой. Концы клеток, обращенных друг к другу, резко обрублены. Капсула выполняет защитную функцию и является носителем вирулентности. Спорообразование происходит в присутствии кислорода и при температуре 15–43 °С. Попадая в организм человека, споры прорастают в вегетативную форму, которая вызывает заболевание.

К у л ь т и в и р о в а н и е. Возбудитель является аэробом. Хорошо растет на основных питательных средах при оптимальной температуре 35–37 °С и pH 7,2–7,4. Температурный диапазон роста составляет 12–45 °С. На МПА образует характерные крупные серебристо-серые колонии с неровными краями, напоминающими «голову медузы Горогоны», львиную гриву либо клубок переплетенных волос. В МПБ дает придонный рост в виде комочков ваты, среда остается прозрачной. *Bacillus anthracis* обладает высокой протеолитической активностью: интенсивно разжижает желатину в виде воронки, быстро свертывает молоко и в течение четырех–пяти дней сгусток пептонизируется с выделением аммиака.

Лептоспироз. Возбудитель лептоспироза относится к порядку *Spirochaetales*, роду *Leptospira*; открыт японскими исследователями Инада и Идо в 1914 г. В 1918 г. Ногучи назвал новые микроорганизмы лептоспирами (от греч. *leptos* – тонкий, нежный, *spira* – спираль, изгиб). Патогенные лептоспиры представлены двумя видами – *L. interrogans* и *L. biflexa*.

М о р ф о л о г и я. Лептоспиры имеют характерную форму – напоминают плотную пружинку с утолщенными и слегка загнутыми концами, что придает им сходство с латинской буквой S; встречаются и прямые формы. Клетки имеют 6–20 мкм в длину и 0,05–0,15 мкм в диаметре. Число первичных завитков 12–18. Лептоспиры подвижны: в жидких средах движение бывает вращательное, прямолинейно-поступательное с одновременным вращением вокруг собственной оси. Поэтому для идентификации лептоспир чаще используют микроскопию живой культуры в темном поле. Лептоспиры окрашиваются по Романовскому–Гимзе в бледно-розовый цвет.

К у л ь т и в и р о в а н и е. Лептоспиры являются факультативными анаэробами. Они не растут на простых питательных средах, для их культивирования используют специальные жидкие среды, содержащие сыворотку крови, сывороточный альбумин или жирные кислоты. В некоторых случаях в среду добавляют пептон, 10 % гидролизата дрожжей и витамины В₁, В₁₂, РР. При росте в жидких средах они не вызывают помутнения, при просмотре в проходящем свете среда опалесцирует, при встряхивании в ней наблюдаются муаровые волны. Лептоспиры растут медленно, при оптимальной температуре 28–30 °С и pH 7,2–7,6 их рост обнаруживается через 5–7 сут.

Листерия. Возбудителем листериоза является *Listeria mono-cytogenes*.

М о р ф о л о г и я. Листерии представляют собой короткие палочки размером $(0,4-0,6) \times (0,5-2,0)$ мкм или коккобактерии с тенденцией образовывать цепочки из трех–пяти и более клеток. В препаратах располагаются поодиночке, парами, часто под углом друг к другу в виде цифры V. Листерии окрашиваются по Граму положительно, однако в старых культурах – отрицательно. Они не образуют спор и капсул, подвижны, с перитрихально расположенными жгутиками, если выращены при 20–25 °С. При 37 °С жгутиков становится мало, обычно клетка имеет один полярный жгутик.

К у л ь т и в и р о в а н и е. Для культивирования листерий используют обычный и печеночный агар, бульон с добавлением 1 % глюкозы, кровяной агар и специальные среды. Колонии листерий просматривают в проходящем свете с голубым фильтром. В отличие от других микроорганизмов, колонии листерий имеют голубую окраску с зеленоватым оттенком и мелкозернистую структуру. При росте возбудителя в бульоне появляется легкое помутнение. На кровяном агаре наблюдается наличие β-гемолиза.

По отношению к кислороду воздуха листерии аэробы или микроаэрофилы. Характерным признаком листерий является наличие у них каталазы. Температурный диапазон роста – от 4 до 38 °С.

Кампилобактериозы. Возбудители кампилобактериозов относятся к семейству *Campylobacteriaceae*, в состав которого входят три рода: *Campylobacter*, *Helicobacter* и *Artrobacter*. Патогенными для человека являются только кампило- и хеликобактеры. Наибольшее значение в патологии человека имеют виды *Campylobacter jejuni*, *C. fetus* и *C. coli*.

М о р ф о л о г и я. Кампилобактеры – тонкие, спирально изогнутые или S-образные палочки размерами $(0,2-0,5) \times (8,0-15)$ мкм. Палочки располагаются одиночно или попарно, напоминая крылья чайки. При микроскопировании молодых культур (через 24 ч) обнаруживаются типичные спиралевидные клетки, тогда как в старых культурах (2–3 сут) присутствуют, помимо спиралевидных, кокковидные или слегка удлинённые (овоидные) образования с гранулированной цитоплазмой. Грамотрицательны, подвижны – имеют один или два полярно расположенных жгутика. Спор и капсул не образуют.

К у л ь т и в и р о в а н и е. Кампилобактеры – обычно микроаэрофилы. Они весьма требовательны к газовому составу среды и не растут при содержании кислорода более 5 %. Оптимальными условиями роста для них являются температура 37–42 °С и pH среды 7,0. На кровяном агаре образуют мелкие, прозрачные, каплеобразные колонии без гемолиза. На МПБ наблюдается равномерное помутнение с образованием осадка. Каталазоположительны.

Иерсиниозы. Возбудители иерсиниозов относятся к отряду *Gracilicutes*, семейству *Enterobacteriaceae*, роду *Yersinia*, который объединяет 11 видов. Иерсинии вызывают различные заболевания: псевдотуберкулез – возбудитель *Yersinia pseudotuberculosis*, кишечный иерсиниоз – возбудитель *Yersinia enterocolitica*, чума – возбудитель *Yersinia pestis*.

М о р ф о л о г и я. Иерсинии – прямые палочки размером $(0,5-0,8) \times (1-3)$ мкм, грамотрицательные, спор не образуют, имеется капсулоподобный слой. При температуре 37 °С неподвижны, а при 20–22 °С становятся подвижными в результате активизации деятельности перитрихальных жгутиков.

К у л ь т и в и р о в а н и е. Иерсинии – факультативные анаэробы. Оптимальная температура роста 22–25 °С, оптимальное pH 7,2–7,4. Микроб неприхотлив и растет на простых питательных средах. При росте на МПБ иерсинии вызывают равномерное помутнение, на плотных средах (МПА) образуют круглые полупрозрачные гладкие колонии диаметром от 0,1 до 1 мм. Иерсинии относятся к группе психрофильных бактерий и могут размножаться при 0–4 °С.

Ку-лихорадка. Возбудитель Ку-лихорадки – *Coxiella burnetii* (род *Coxiella*, семейство *Rickettsiaceae*) – впервые был выделен в 1937 г. Э. Дерриком в Австралии.

М о р ф о л о г и я. Риккетсии Бернета представляют собой мелкие палочковидные или кокковидные образования. По Романовскому–Гинзе окрашиваются в ярко-красный цвет.

К у л ь т и в и р о в а н и е. Риккетсии являются облигатными паразитами. Их культивируют в желточном мешке куриного эмбриона и в культуре тканей.

Туляремия. Возбудитель туляремии – *Francisella tularensis* – был открыт в 1912 г. Г. Мак-Коем и Ш. Чепиным. Название микроорганизм получил по наименованию района Туляре в Калифорнии, где исследователи выделили возбудителя.

М о р ф о л о г и я. Возбудители туляремии – очень мелкие кокковидные и палочковидные бактерии размером $(0,1-0,2) \times (0,2-0,7)$ мкм, грамтрицательные, неподвижные, спор не образуют, имеют небольшую капсулу.

К у л ь т и в и р о в а н и е. Факультативные анаэробы. На простых питательных средах не растут. Для размножения возбудителя в среду необходимо добавлять цистеин. Может расти на средах, содержащих яичный желток, или на кровяном агаре с добавлением цистеина и глюкозы. На плотных средах образует небольшие колонии белого цвета.

Дизентерия. Возбудители дизентерии относятся к отряду Gracilicutes, семейству Enterobacteriaceae, роду *Shigella*. В международной практике различают следующие группы шигелл: А – *Shigella dysenteriae*; В – *Shigella flexneri*; С – *Shigella boydii*; D – *Shigella sonnei*.

М о р ф о л о г и я. Возбудители дизентерии – мелкие палочки с закругленными концами размером $(0,5-0,7) \times (2,0-3,0)$ мкм, неподвижны, спор не образуют, грамтрицательны. У многих штаммов обнаруживают ворсинки общего типа и половые пили. Некоторые шигеллы имеют микрокапсулу.

К у л ь т и в и р о в а н и е. Возбудители дизентерии являются факультативными анаэробами. Они не требовательны к питательным средам, их оптимальная температура роста 37 °С, pH 7,2–7,4. На плотных средах шигеллы вырастают в виде мелких прозрачных колоний. На МПА шигеллы образуют колонии двух типов: S- и R- форм. Постоянная диссоциация колоний является важным диагностическим признаком для микроорганизмов этой группы. Средой обогащения для выделения и культивирования шигелл является селенитовый бульон. На среде Эндо колонии шигелл бесцветны, что связано с отсутствием у них ферментов, катализирующих расщепление лактозы.

Холера. Возбудитель холеры – *Vibrio cholerae* относится к семейству Spirillaceae. По ферментативным и биологическим признакам различают два биотипа возбудителей – классический холерный вибрион *Vibrio cholerae* biotip cholerae и вибрион Эль-Тор (*Vibrio cholerae* biotip eltor). Кроме холерных вибрионов, в окружающей среде (в кишечнике человека и животных, в воде открытых водоемов и колодцев) находится большое количество патогенных и непатогенных для человека вибрионов (холероподобные, парاخолерные, водные), дифференцировать которые очень трудно.

М о р ф о л о г и я. Холерный вибрион имеет форму палочки, изогнутой в виде запятой, размером $(0,2-0,4) \times (1,5-4,0)$ мкм. Чрезвычайно подвижный (монотрих), спор и капсул не образует, грамтрицательный.

К у л ь т и в и р о в а н и е. *V. cholerae* – строгий аэроб, поэтому на поверхности жидких питательных сред образует пленку. Оптимальная температура роста 37 °С. Наиболее благоприятное значение pH 8,0–9,0. На поверхности щелочного мясопептонного агара образуются мелкие голубоватые колонии с гладкой поверхностью и ровными краями. В 1 %-й пептонной воде с 0,5 % хлорида натрия вибрионы вырастают за 6–8 ч, образуя слабую муть и нежную пленку на поверхности среды, в то время как другие микроорганизмы на этой среде вырастают только за 20–24 ч.

Брюшной тиф и паратифы А и В. Возбудителями брюшного тифа и паратифов являются бактерии рода *Salmonella* (семейство Enterobacteriaceae). Возбудитель брюшного тифа был открыт в 1880 г. Д. Сальмоном. *S. typhi* – возбудитель брюшного тифа, *S. paratyphi* А, В – возбудители паратифов А, В.

М о р ф о л о г и я. Сальмонеллы – мелкие палочки с закругленными концами размером $(1-3) \times (0,5-0,7)$ мкм, грамтрицательные, подвижные (перитрихи). Спор и цист не образуют.

К у л ь т и в и р о в а н и е. Сальмонеллы – факультативные анаэробы. На МПА они образуют мелкие колонии диаметром 2–4 мм, прозрачные, нежно-голубого цвета. Сальмонеллы хорошо растут на питательных средах для энтеробактерий: колонии на среде Эндо – розоватые, полупрозрачные; на среде Плоскирева – коричневые (в цвет среды); на висмут-сульфит-агаре – черные с металлическим блеском. Сальмонеллы могут расти в

диапазоне температур от 7 до 45 °С, оптимальная температура размножения – 35–37 °С. Оптимальные значения рН среды 6,5–7,5; диапазон роста 4,1–9,0.

Порядок выполнения работы

1. Изучить свойства возбудителей пищевых инфекций и условия их культивирования.
2. Зарисовать в тетради микроскопические картины возбудителей пищевых инфекций.
3. Заполнить таблицу сравнительной характеристики разных видов возбудителей алиментарных заболеваний.
- 4*(задание повышенной сложности). Заполнить таблицу сравнительной характеристики эмерджентных патогенов.

Контрольные вопросы

1. Классификация и меры предупреждения развития в пищевых продуктах возбудителей пищевых отравлений.
2. Свойства, характеристика вызываемых заболеваний, нормирование и определение возбудителей пищевых отравлений – токсикозов.
3. Свойства, характеристика вызываемых заболеваний, нормирование и определение возбудителей пищевых отравлений – токсикоинфекций.
4. Классификация и меры предупреждения развития в молоке и молочных продуктах возбудителей пищевых инфекций.
5. Свойства, характеристика вызываемых заболеваний, нормирование и определение возбудителей пищевых инфекций человека.
6. Свойства, характеристика вызываемых заболеваний, нормирование и определение возбудителей пищевых инфекций человека и животных (зооантропонозов).

Лабораторная работа № 7 ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ САНИТАРНО-ПОКАЗАТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы: изучить свойства, методы обнаружения и идентификации санитарно-показательных микроорганизмов, встречающихся в молоке.

Теоретические положения

Основными санитарно-показательными микроорганизмами, нормируемыми во всех молочных продуктах, являются бактерии группы кишечных палочек (БГКП). В эту группу входят представители нескольких родов семейства *Enterobacteriaceae*, в т. ч. *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*.

В соответствии с ГОСТом к БГКП относятся мелкие подвижные грамотрицательные, не образующие спор палочки, не обладающие оксидазной активностью, ферментирующие лактозу и глюкозу с образованием кислоты и газа при температуре 37 °С в течение 5 – 24 ч. На этих свойствах основано определение БГКП в элективных средах (Кесслер по образованию газа или Кода по изменению цвета). Дифференциально-диагностическая – среда Эндо, на которой коли-формы (кишечные палочки вида *Escherichia coli*) образуют красные колонии с металлическим блеском.

Во многих стандартах на молочные продукты наряду с определением санитарно-показательных микроорганизмов в качестве косвенного показателя санитарно-гигиенических условий производства нормируют количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), которое измеряется в колониеобразующих единицах (КОЕ/г), а также количество дрожжей и плесеней (КОЕ/г).

К основным мерам предупреждения развития санитарно-показательной микрофлоры относятся:

1. Использование доброкачественного молока.
2. Строгое соблюдение правил мойки и дезинфекции оборудования, аппаратуры, полов и стен в производственных цехах.

3. Соблюдение технологических режимов тепловой обработки сырья, получения, хранения, транспортировки готовой продукции.
4. Строгое соблюдение правил личной гигиены работниками предприятий.
5. Систематический санитарно-микробиологический контроль сырья, готовой продукции, состояния производства.

Определение БГКП на среде Кесслер основано на способности БГКП сбраживать в питательной среде лактозу при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч с образованием кислоты и газа и предназначен для оценки санитарно-гигиенических показателей сырья, производственного процесса, готового продукта и выявления источника микробиологической порчи продукта.

В среду Кесслер проводят посев продуктов в количествах, указанных в таблице 7.1.

Таблица 7.1 – Объем или масса засеваемого продукта при определении БГКП на среде Кесслер

Наименование продукта	Объем или масса продукта, рекомендуемые для посева, см ³ или г
Молоко и сливки сырые	от 0,1 до 0,00001
Пахта-сырьё, сыворотка-сырьё	0,1; 0,01; 0,001
Молоко, сливки, пахта, сыворотка, отобранные после пастеризации	10
Молоко, сливки, пахта, сыворотка пастеризованные	1; 0,1; 0,01
Закваска на чистых культурах	10
Закваска кефирная	3
Ферментированные молочные продукты из молока, сливок, пахты, сыворотки	1; 0,1; 0,01
Молоко сухое, сливки сухие, ЗЦМ, сухие продукты из пахты, сыворотки	1; 0,1
Творог, творожная масса, творожные продукты, продукты на их основе	0,1; 0,01; 0,001
Сметана и продукты на ее основе	0,1; 0,01; 0,001
Масло из коровьего молока, масляная паста, молочный жир, спреды и смеси топленые, стерилизованное масло (в потребительской и транспортной таре)	1; 0,1; 0,01
Сыр после прессования	от 0,001 до 0,00001
Сыр зрелый (или в конце созревания), сырные продукты, включая плавленые (в потребительской и транспортной таре)	от 0,1 до 0,001
Альбуминные и сырные пасты, сыр домашний (в потребительской и транспортной таре)	от 0,1 до 0,00001
Сгущенные продукты переработки молока	1,0; 0,1; 0,01

По 1 см³ соответствующих разведений продукта засевают в пробирки с 5 см³ среды Кесслер. Посев 10 см³ пастеризованного молока, отобранного после пастеризатора, и 10 см³ закваски проводится в конические колбы с 40 – 50 см³ среды Кесслер. Пробирки с посевами помещают в термостат при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 18 – 24 ч. При исследовании продуктов, хранящихся при минусовой температуре, пробирки с посевом выдерживают в термостате при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48 ч.

Просматривают пробирки или колбы с посевами и определяют наличие бактерий группы кишечных палочек по газообразованию. При отсутствии газообразования в

наименьшем из засеваемых объемов дают заключение об отсутствии БГКП. При наличии газообразования в наименьшем из засеваемых объемов считается, что БГКП обнаружены в нем.

Определение количества БГКП на среде агар желчный фиолетово-красный (АЖФК) основано на способности БГКП образовывать типичные розовато-фиолетовые колонии диаметром больше 0,5 мм с более светлым по сравнению с центром ореолом на плотной среде при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч и предназначен для оценки санитарно-гигиенических показателей готового продукта, и выявления источника микробиологической порчи.

Индикация БГКП на среде КОДА основана на способности БГКП сбрасывать в питательной среде лактозу при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч с образованием кислоты, что приводит к изменению цвета индикатора с зеленого на желтый при развитии цитратотрицательных БГКП.

Метод дифференциации энтеробактерий на среде Эндо основан на способности ферментирующих лактозу энтеробактерий (БГКП) образовывать на среде темно-красные колонии с характерным металлическим блеском вследствие взаимодействия образующихся альдегидов с фуксином в присутствии сульфита натрия при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. Метод предназначен для дифференциации энтеробактерий по виду образуемых на среде колоний.

На среду Эндо делают посевы с накопительных сред (Кесслер, Кода, ГПС, ЛПС) с признаками роста БГКП. Из пробирок с накопительными средами с признаками роста БГКП, проводят посев петлей на среду Эндо. Исследуемый материал отбирают бактериальной петлей. Бактериальную петлю кладут на поверхность питательной среды и проводят штрихи по поверхности среды, располагая штрихи как можно ближе друг к другу для получения в конце штриха изолированных колоний. Для выполнения нескольких посевов на одной чашке дно чашки предварительно делят на равные сектора (рекомендуется не более 4 секторов).

Чашки с посевами переворачивают вверх дном и помещают в термостат при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 18–24 ч. Результаты посевов оценивают визуально по характеру образовавшихся колоний:

- ✓ образование красных или темно-красных колоний с металлическим блеском на среде Эндо свидетельствует о принадлежности микроорганизмов, давших рост на накопительных питательных средах, к лактозоположительным энтеробактериям (БГКП);
- ✓ образование полупрозрачных бесцветных или бледно-розовых колоний свидетельствует о принадлежности микроорганизмов, давших рост на накопительных питательных средах, к лактозотрицательным энтеробактериям.

При появлении на среде полупрозрачных бесцветных или бледно-розовых колоний необходимо проводить контроль на предмет наличия патогенных энтеробактерий (сальмонеллы, шигеллы). Контроль проводится в лабораториях, лицензированных на право работы с патогенными микроорганизмами.

Определение БГКП может также проводиться с использованием микробитестов. Из светонепроницаемого пакета, содержащего полиэтиленовые пакеты с микробитестами, вынимают один пакет с микробитестом и с одной стороны разрезают его ножницами. Микробитест вместе с полиэтиленовым пакетом перегибают вдоль по середине, вынимают из пакета, беря за перфорированный конец. Микробитест смачивают в исследуемом разведении путем однократного погружения, которое длится 5 с. Излишек влаги удаляют путем прикосновения конца микробитеста к стенке пробирки или колбы с разведением. При намачивании микробитест впитывает $0,2\text{ см}^3$ разведения продукта или смыва. Затем микробитест вновь помещают в полиэтиленовый пакет, перфорированный конец удаляют. После помещения микробитеста в пакет для удаления воздуха из пакета его следует тщательно прогладить рукой, чтобы полиэтиленовая пленка с обеих сторон плотно прилегла к смоченному микробитесту. Разрезанную сторону пакета зажимают между двумя пластинками из негорючего материала, запаивают на пламени горелки и помещают в пакет из светонепроницаемого материала.

Пакет из светонепроницаемого материала с микробитестом помещают в термостат и выдерживают при температуре $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение (43 ± 2) ч. Микробитест в термостате должен находиться в строго горизонтальном положении. После культивирования проводят подсчет колониеобразующих единиц (красных точек) на обеих сторонах микробитеста.

Определение общего количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) основано на подсчете колоний мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, вырастающих на плотной питательной среде КМАФАнМ при $(30 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 72 ч.

Количество засеваемого продукта устанавливают с учетом наиболее вероятного микробного обсеменения. Для определения общего количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов выбирают те разведения, при посевах которых на чашках вырастает не менее 30 и не более 300 колоний. Из каждой пробы делают посев на две-три чашки из нужных разведений. Каждое из разведений должно быть засеано в количестве 1 см^3 в одну чашку Петри с заранее маркированной крышкой и залито $(14 \pm 1)\text{ см}^3$ расплавленной и охлажденной до температуры $40\text{--}45\text{ }^{\circ}\text{C}$ питательной средой для определения общего количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

После застывания агара чашки Петри переворачивают крышками вниз и ставят в таком виде в термостат с температурой $(30 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 72 ч. Каждую чашку помещают вверх дном на темном фоне и проводят подсчет количества выросших колоний, пользуясь лупой с увеличением в 4–10 раз. Каждую подсчитанную колонию отмечают на дне чашки чернилами. При подсчете колоний рекомендуется пользоваться счетчиками. При большом числе колоний и равномерном их распределении дно чашки Петри делят на четыре и более одинаковых сектора, подсчитывают число колоний на двух-трех секторах (но не менее чем на $1/3$ поверхности чашки), находят среднее арифметическое число колоний и умножают на общее количество секторов всей чашки.

Находят общее количество колоний, выросших на одной чашке. Число КОЕ в 1 см^3 или 1 г продукта вычисляют, умножая количество колоний на 10 в степени разведения. За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое, полученное по всем чашкам.

Задания и порядок выполнения работы

1. Изучите теоретические положения работы.
2. Изучите свойства бактерий группы кишечных палочек (БГКП) в следующей последовательности:
 - опишите особенности роста БГКП в элективных средах Кесслер и Кода, сравнивая ее с контролем, объясните изменения среды;
 - опишите колонии *Escherichia coli* (кишечной палочки) на дифференциально-диагностических средах Эндо и АЖФК;
 - просмотрите под микроскопом при увеличении 90×15 и зарисуйте в тетради готовые препараты с окраской по Граму;
 - опишите методы определения БГКП и коли-форм, составьте и зарисуйте схему выделения и дифференциации БГКП.

3. Изучите метод определения КМАФАнМ, запишите его в тетради. Проведите учет КМАФАнМ по предварительно подготовленным посевам по заданию преподавателя.

4. Сделайте выводы по работе.

Аппаратура, оборудование и материалы:

Аппаратура и оборудование: на одно рабочее место: микроскоп, готовые препараты кишечной палочки.

Реактивы и материалы – среда Кесслер с посевами БГКП и контрольная, среда Эндо с типичными колониями кишечной палочки,

Посуда – пробирки, чашки Петри.

Содержание отчета, форма и правила оформления отчета о выполненной работе

Отчет по лабораторной работе оформляется в специальной тетради и содержит: дату, название, цель работы, описание методов определения БГКП и КМАФАнМ, результаты

исследования свойств БГКП (зарисовка препаратов кишечной палочки и описание морфологических свойств, роста на средах Кесслер, Кода, Эндо и АЖФК), схема выделения и дифференциации БГКП; результаты учета КМАФАнМ; выводы по работе.

Контрольные вопросы и защита работы

7. Назначение введения понятия «санитарно-показательные микроорганизмы» и требования к ним.

8. Свойства, методы обнаружения и предупреждение развития бактерий группы кишечной палочки (БГКП).

9. Методы определения КМАФАнМ и других групп санитарно-показательных микроорганизмов.

Лабораторная работа № 8, 9

Определение соответствия микробиологических показателей пищевых продуктов из растительного сырья, виноделия и бродильных производств требованиям стандартов (посев, учет)

Цель и содержание: проверить и закрепить полученные при изучении дисциплины знания и навыки при составлении схем исследования и выполнении посевов для определения микробиологических показателей пищевых продуктов, нормируемых стандартами.

Аппаратура и материалы: образцы качественной и некачественной продукции разных видов от разных предприятий–изготовителей, стандарты, пробирки со стерильной водой, пипетки, колбы, стандартные питательные среды (МПА, Кесслер, ОМ, БФ), предметные стекла, красители, микроскопы.

Методика и порядок выполнения работы

1. Самостоятельно провести микробиологическое исследование полученных образцов молочной продукции в соответствии с индивидуальным заданием в следующей последовательности:

- оценить внешний вид, целостность упаковки, сроки хранения, органолептические показатели продукции;
- определить по действующим законодательным документам (СанПиНам) нормируемые микробиологические показатели, обратив особое внимание на нормирование патогенных микроорганизмов;
- разработать схемы проведения микробиологических исследований, определив количество необходимых разведений, питательные среды, время и температуру термостатирования;
- оформить схемы определения микробиологических показателей пищевых продуктов в тетради;
- выполнить необходимые разведения и посевы, поставить их на термостатирование;
- подготовить препараты пищевых продуктов и просмотреть их под микроскопом, сделать зарисовки в тетрадях с необходимыми подписями и выводами о наличии или отсутствии посторонней микрофлоры.

2. Учесть посевы, оформить результаты работы в виде таблицы 8.1.

Таблица 8.1 – Результаты исследования микробиологических показателей пищевых продуктов

Название продукта	Нормируемый показатель	Норма	Значение показателя по результатам исследований

2. По результатам исследований сделать выводы о соответствии продукции требованиям стандартов.

3. Если образцы не соответствуют требованиям стандартов, определить вид порока, причины его возникновения и меры по предотвращению его возникновения на основе анализа критических точек технологии.

Содержание отчета и его форма: нормативы на исследуемые виды пищевых продуктов, схемы посевов, зарисовки препаратов пищевых продуктов с выводами о наличии посторонней микрофлоры. Таблица результатов исследований, выводы о соответствии продукта требованиям регламентирующих документов.

Контрольные вопросы и защита работы

1. Основные микробиологические показатели, нормируемые современными законодательными документами для пищевых продуктов из растительного сырья, виноделия и бродильных производств.
2. Этапы микробиологических исследований сырья и готовой продукции.
3. Методы определения микробиологических показателей сырья и готовой продукции.
4. Особенности нормирования микробиологических показателей для разных пищевых продуктов.

10.1. Рекомендуемая литература

10.1.1. Основная литература:

1 Федорова, О. С. Пищевая микробиология : учебное пособие для студентов магистратуры по направлению подготовки 19.04.01 «Биотехнология» всех форм обучения / О. С. Федорова. — Красноярск : Сибирский государственный университет науки и технологий имени академика М.Ф. Решетнева, 2018. — 116 с. — Текст : электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART : [сайт]. — URL: <https://www.iprbookshop.ru/94897.html>

Рябцева, С.А. Микробиология молока и молочных продуктов : учебное пособие / С.А. Рябцева, М.Н. Панова ; Северо-Кавказский федеральный университет. — Ставрополь : Северо-Кавказский Федеральный университет (СКФУ), 2017. — 220 с. : ил. — Режим доступа: по подписке. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=467286> (дата обращения: 20.04.2021). — Библиогр. в кн. — Текст : электронный..

2 Артюхова, С.И. Биотехнология микроорганизмов: пробиотики, пребиотики, метабитики : [16+] / С.И. Артюхова, О.В. Козлова ; Кемеровский государственный университет. — Кемерово : Кемеровский государственный университет, 2019. — 225 с. : ил. — Режим доступа: по подписке. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=600329> (дата обращения: 20.04.2021). — Библиогр.: с. 192 - 214. — ISBN 978-5-8353-2548-1. — Текст : электронный

10.1.2. Дополнительная литература:

1. Петухова, Е.В. Пищевая микробиология : учебное пособие / Е.В. Петухова, А.Ю. Крыницкая, З.А. Канарская ; Министерство образования и науки России, Казанский национальный исследовательский технологический университет. — Казань : Казанский научно-исследовательский технологический университет (КНИТУ), 2014. — 117 с. : табл., ил. — Режим доступа: по подписке. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=428098> (дата обращения: 20.04.2021). — Библиогр. в кн. — ISBN 978-5-7882-1594-5. — Текст : электронный. Меркулова, Н. Г. Производственный контроль в молочной промышленности : практическое руководство / Н. Г. Меркулова, М. Ю. Меркулов, И. Ю. Меркулов. — Санкт-Петербург : Профессия, 2009. — 653 с.
2. Мудрецова-Висс, К. А. Микробиология, санитария и гигиена : учебник / К. А. Мудрецова-Висс, В. П. Дедюхина. - М. : ФОРУМ : ИНФРА-М, 2009. - 400 с. : ил. - (Высшее образование). - Библиогр.: с. 394-395. - ISBN 978-5-8199-0350-6. - ISBN 978-5-16-003263-4
3. Микробиология вторичного молочного сырья : Монография / С. А. Рябцева, И. А.

Евдокимов, О. В. Кузнецова, Г. С. Анисимов ; Сев-Кав. федер. ун-т. - Ставрополь : СКФУ, 2014. - 174 с. : ил. - Библиогр.: с. 161-171. - ISBN 978-5-9296-0697-7

4. Скокан, Л. Е. Микробиология основных видов сырья и полуфабрикатов в производстве кондитерских изделий : [монография] / Л. Е. Скокан, Г. Г. Жарикова. - М. : ДеЛи принт, 2006. - 148 с.
5. Микробиология продуктов животного происхождения / [Г.-Д. Мюнх, Х. Заупе, М. Шрайтер и др.] ; пер. с нем. Е. Г. Токаря ; под ред. Н. С. Королевой, Н. В. Билетовой, Р. П. Корнелаевой. - М. : Агропромиздат, 1985. - 592 с.

10.1.4. Интернет-ресурсы:

1. http://www.edu.ru/modules.php?op=modload&name=Web_Links&file=index&l_op=viewlink&cid=1697 – Федеральный портал «Российское образование», раздел «Пищевая промышленность»;
2. <http://www.news.d2d.ru/exhibitions/molinform> - межотраслевой информационно-консультационный центр Молинформ;
3. <http://www.foodinfo.ru/> - информационный центр пищевой и перерабатывающей промышленности.

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические указания
по выполнению практических занятий
по дисциплине «**Пищевая микробиология**»
для студентов направления подготовки
19.04.01 Биотехнология

Направленность (профиль) Биотехнология производства продукции из растительного сырья,
виноделия и бродильных производств

Цель: изучить требования к организации производственных микробиологических лабораторий

Теоретическое обоснование

ГОСТ ISO 7218—2015 «МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям» устанавливает общие требования и дает рекомендации/варианты по трем основным направлениям: - внедрение стандартов Технического комитета ISO/TC 34/SC 9 или TC 34/SC 5 по обнаружению и подсчету микроорганизмов, здесь и далее называемых соответствующими «стандартами на конкретный метод испытания»; - надлежащая лабораторная практика для микробиологических лабораторий, исследующих пищевые продукты (в задачи настоящего стандарта не входит их описание, для этого имеются специальные справочники); - руководство по аккредитации микробиологических лабораторий (в настоящем стандарте описываются технические требования согласно приложению В, [44] для аккредитации микробиологических лабораторий национальными органами).

3 Помещения 3.1 Общие положения В данном разделе представлены общие требования и принципы планирования и организации при размещении микробиологической лаборатории. Экспертизу проб на стадии производства пищевого сырья (особенно для приемки проб и стандартной подготовки проб) следует проводить отдельно от исследования других проб, чтобы уменьшить риск перекрестного загрязнения.

3.2 Условия безопасности Проектирование лаборатории должно учитывать требования безопасности, которые будут зависеть от типа эпидемиологической опасности микроорганизма. По этому принципу микроорганизмы классифицируются на четыре категории риска: - 1-я группа опасности (группа патогенности) (отсутствие риска или очень низкий риск для отдельного человека и общества).

Вероятность заражения таким микроорганизмом человека или животного мала. - 2-я группа опасности (группа патогенности) (умеренный риск для отдельного человека, низкий риск для общества).

Это патоген, который может вызвать заболевание у человека или животного, но не представляющий серьезной угрозы для сотрудников лаборатории, общества или окружающей среды. Контакт с таким микроорганизмом в лаборатории может вызвать серьезную инфекцию у человека, но имеются способы эффективного лечения и профилактические меры, а риск распространения инфекции ограничен. - 3-я группа опасности (группа патогенности) (высокий риск для индивидуума, низкий риск для общества).

Это патоген, который способен вызвать тяжелую болезнь у человека или животного, но обычно не распространяется от одного инфицированного индивидуума к другому. Существуют способы эффективного лечения и меры профилактики. 4-я группа опасности (группа патогенности) (высокий риск для индивидуума и для общества).

Это патоген, который обычно вызывает тяжелую болезнь у человека или животного и легко передается от больного к здоровому человеку или животному прямым контактом или с помощью другого механизма передачи возбудителя. Эффективных способов лечения и профилактических мер обычно не существует.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Группа опасности микроорганизма, распространенного в пределах конкретной страны, устанавливается соответствующими национальными нормативными документами. 3.3 Проектирование лаборатории Рекомендации и правила по принципам обустройства лабораторий, описываемые ниже, применимы к исследованиям по выявлению микроорганизмов, относящихся к 1-й, 2-й и 3-й группам опасности в области микробиологии пищевых продуктов.

Следует принять во внимание, что в зависимости от конкретного национального законодательства может возникнуть необходимость в дополнительных мерах безопасности.

3.4 Участки лаборатории

3.4.1 Общие положения Лаборатория включает отдельные участки, предназначенные для работы с пробами и их исследованием (см. 3.4.2) и общие помещения (см. 3.4.3). Они должны быть разделены.

3.4.2 Участки, предназначенные для работы с пробами и их исследованием Необходимо, чтобы лаборатория имела отдельные помещения или четко обозначенные зоны для следующих операций: - приемки, регистрации и хранения проб; - подготовки проб, особенно в случае сырья (например, порошкообразные продукты, содержащие высокое количество микроорганизмов); - экспертизы проб (начиная от исходной суспензии), включая инкубацию (термостатирование) посевов; - манипуляций с предполагаемыми патогенами; - хранения контрольных и других штаммов; - приготовления и стерилизации питательных сред и оборудования; - хранения питательных сред и реактивов; - экспертизы пищевых продуктов на стерильность; - деактивации (обеззараживания); - подготовки стеклянной посуды и другого оборудования; - хранения опасных химических веществ, предпочтительно в предназначенных для этого боксах, шкафах, отдельных комнатах или строениях.

3.4.3 Общие участки Отдельно должны быть предусмотрены следующие участки: - входы, коридоры, лестницы, лифты; - административные помещения (например, комната для секретаря и офисные комнаты, комнаты для работы с документами и т. д.); - раздевалки и туалеты; - помещение для хранения архива; - кладовые; - комнаты отдыха. 3.5 Расположение и оснащение помещений 3.5.1 Цели Цель состоит в том, чтобы условия окружающей среды, в которой проводят микробиологические исследования, не влияли на достоверность получаемых результатов исследований.

Помещения располагают таким образом, чтобы избежать риска перекрестного заражения. С этой целью необходимо соблюдать следующие положения: а) организацию помещений лаборатории согласно принципу «нет пути назад», то есть без пересечения потоков; б) выполнять процедуры последовательно, придерживаясь правил необходимой безопасности, чтобы гарантировать чистоту и целостность пробы (например, путем использования герметичных и опломбированных контейнеров); с) разделять деятельность при выполнении различных этапов работы во времени и пространстве.

Необходимо избегать экстремальных ситуаций, таких как повышенная температура, запыленность, повышенная влажность, пар, шум, вибрация и т. д.

Помещения и площадь для лаборатории должны быть достаточными для поддержания чистоты и порядка в них. Помещения и площадь лаборатории должны быть соизмеримы с объемом проводимых исследований и общей внутренней организации лаборатории. Они должны соответствовать требованиям национальных инструкций или регламентов, если таковые существуют. 3.5.2 Оборудование помещений Чтобы уменьшить риск загрязнения пылью и, следовательно, микроорганизмами (для 3-й группы опасности необходимо соблюдать национальные нормативные документы), помещения для проведения исследований должны быть построены и оборудованы следующим образом: а) стены, потолки и поверхность пола должны быть гладкими, стойкими к моющим и дезинфицирующим средствам, используемым в лаборатории, легко мыться; б) полы не должны быть скользкими; с) верхние трубы, по которым проходит жидкость, не должны пересекать помещение, если они герметично не изолированы. Все другие навесные конструкции должны быть закрыты, но легко доступны при необходимости их периодической очистки; d) при проведении исследований окна и двери должны быть закрытыми. Конструкция окон и дверей должна исключать возможность скопления пыли и облегчать их чистку. Окружающая температура (от 18 °C до 27 °C) и качество воздуха (содержание микроорганизмов, скорость распространения пыли и т. д.) должны удовлетворять условиям проведения исследований. Для этой цели рекомендуется использовать вентиляционную систему, оборудованную фильтрами для очистки поступающего в помещение воздуха и воздуха, удаляемого из помещения; е) необходимо установить адекватную систему вытяжной вентиляции, чтобы предотвратить распыление

при работе, возникающее при приготовлении дегидратированных питательных сред, пылеобразных и порошковых проб; f) если исследования необходимо проводить в атмосфере с низким уровнем контаминации, комната должна быть специально оборудована чистым ламинарным шкафом с потоком воздуха и/или безопасным боксом; д) если необходимо, помещения лаборатории должны быть защищены от вредных воздействий солнечной радиации с помощью ставней или специально обработанных стеклянных панелей. Не допускается устанавливать шторы или жалюзи изнутри, поскольку их трудно чистить, и они могут быть источником пыли.

3.5.3 Прочие условия Необходимо также предусмотреть выполнение следующих условий: - подведение воды надлежащего качества для использования; - наличие электрического питания;

- подведение газа (по трубам — централизованного или в баллонах); - достаточное освещение в каждой зоне лаборатории; - поверхности лабораторного инвентаря и мебели должны быть изготовлены из гладкого, непроницаемого материала, который легко мыть и дезинфицировать; - лабораторная мебель должна быть разработана таким образом, чтобы облегчить ее обработку (например, передвижная мебель); - в помещениях, где проводят исследования проб, не должны находиться мебель, документация и другие вещи, которые не применяют при проведении исследования; - документацию, используемую в работе с пробами, питательными средами, реактивами и т. п. необходимо хранить в закрытых шкафах или ящиках столов; - в каждой комнате, где проводят исследования, необходимо установить раковины для мытья рук и, если необходимо, в других участках, предпочтительно около двери; - наличие автоклава для обеззараживания зараженных отработанных материалов и использованных питательных сред, если нет специальной системы для удаления зараженных отходов для сжигания на месте; - обеспечение защитными системами для борьбы с огнем (огнетушители, ведра и т. д.), системой аварийного электропитания, аварийного обеспечения водой для душа и промывания глаз; - обеспечение средствами для оказания первой помощи.

3.6 Чистка и дезинфекция Необходимо соблюдение следующих аспектов: а) полы, стены, потолки, поверхности лабораторных столов, мебель следует содержать в чистоте и ремонтировать, чтобы избежать образования трещин, которые могут быть источником загрязнения; б) чтобы содержать помещение в состоянии, пригодном для проведения исследований, уборку и дезинфекцию следует выполнять постоянно. Загрязненные или потенциально зараженные поверхности следует дезактивировать, для чего необходимо использовать дезинфицирующие средства, обладающие способностью уничтожать бактерии и грибы.

П р и м е ч а н и е — Комнаты и оборудование могут быть дезактивированы окуриванием парами формальдегида, если это допускается национальными нормативными документами. с) системы вентиляции и их фильтры следует регулярно проверять, при необходимости, с заменой фильтров на новые; d) микробиологическое состояние рабочих поверхностей лаборатории, поверхностей, с которыми соприкасается персонал, а также воздух необходимо регулярно проверять (частота проверок зависит от результатов предыдущих исследований); е) загрязненность поверхностей следует оценивать наложением на них пластин, содержащих соединения, способные нейтрализовать дезинфицирующие вещества (например, лецитин, тиосульфат натрия). Качество воздуха может быть исследовано при экспозиции открытой чашки Петри в течение 15 мин, содержащей неселективную агаровую питательную среду [например, среду для подсчета колоний — мясопептонный агар — МПФ-РСА (plate count agar)] или селективную агаровую среду, используемую для выявления искомым микроорганизмов (например, плесеней).

4.3 Проверка квалификации персонала лаборатории Проверку квалификации работающего персонала в лаборатории необходимо проводить регулярно, основываясь на объективных параметрах. Она включает участие в программах по внутреннему контролю качества, проверку квалификации (см. ISO 43-1), использование стандартных образцов или проверку по тестам самооценки при подсчете микроорганизмов, как описано в [42].

4.4 Гигиена

В лаборатории следует соблюдать следующие меры личной гигиены, чтобы избежать загрязнения проб и питательных сред, а также избежать риска инфицирования персонала: а) Лабораторная одежда должна быть застегнутой надлежащим способом, чистой, в хорошем состоянии, изготовленной из ткани, ограничивающей риск воспламенения. Эту одежду не следует носить вне рабочей зоны и, в частности, в ней нельзя выходить в туалет. б) На волосистой части головы и лица следует надеть защитные повязки. в) Ногти следует содержать в чистоте и желателно короткими. г) Необходимо мыть руки в теплой воде из нерегулируемого ручного крана до и после микробиологических исследований, а также после посещения туалета. Рекомендуется использовать жидкое или порошковое мыло, или другое дезинфицирующее средство, поступающее из дозатора, поддерживаемого в чистом состоянии. Для сушки рук следует использовать одноразовые бумажные или матерчатые салфетки или полотенца. Эти предосторожности относятся как к персоналу лаборатории, так и посетителям. д) При работе с открытыми пробами, питательными средами и при посеве материала не допускается разговаривать, кашлять и т. д. е) Люди, имеющие инфекционные заболевания кожи или страдающие заболеваниями кожи, должны предпринимать меры предосторожности, если микроорганизмы от них способны инфицировать пробы, что может отразиться на результатах исследований. ж) В лаборатории нельзя принимать пищу, пить, оставлять пищевые продукты для личного потребления в лабораторных холодильниках или морозильных камерах. з) Недопустимо осуществлять пипетирование ртом.

5.2 Бокс биологической безопасности для микробиологических исследований
5.2.1 Описание
Бокс биологической безопасности для микробиологических исследований — это рабочее помещение, оснащенное установкой для горизонтального и вертикального ламинарных потоков воздуха, предназначенной для удаления пыли и других частиц из воздуха, в том числе микроорганизмов.

Максимально допустимое количество частиц в кубическом метре с размером не менее или равным 0,5 мкм представляет класс устранения пыли из защитного бокса с очисткой воздуха. Для боксов, используемых в микробиологии пищевых продуктов, количество частиц должно быть не более 4000 в кубическом метре.

Боксы для использования в лабораториях микробиологии пищевых продуктов подразделяют на четыре типа. а) Боксы биологической безопасности класса I — это открытые с лицевой стороны безопасные вытяжные шкафы, защищающие оператора и окружающую среду, но не защищающие продукт от загрязнения извне. Потенциально инфицированные аэрозоли будут циркулировать внутри бокса и затем поглощаться фильтром. Отфильтрованный воздух затем поступает в атмосферу; если этого не происходит, воздух должен пройти через два сухих воздушных фильтра (HEPA), установленных последовательно. Данный тип боксов не допускается для работы с микроорганизмами 3-й группы патогенности из-за трудностей в поддержании и обеспечении соответствующей безопасности оператора. б) Боксы биологической безопасности класса II защищают продукт, оператора и окружающую среду. В них профильтрованный воздух циркулирует, а часть выделяется в атмосферу и заменяется воздухом через рабочее отверстие. Таким образом, обеспечивается защита оператора. Эти боксы подходят для работы с микроорганизмами 2-й и 3-й групп патогенности. в) Ламинарные боксы с горизонтальным оттоком воздуха защищают рабочее место от загрязнения, но выносят любые аэрозоли на лицо оператора. Поэтому они не могут использоваться для работы с инокулируемыми культурами или для приготовления культуры ткани. г) Ламинарные боксы с вертикальным потоком воздуха защищают продукт при помощи вертикального ламинарного потока воздуха, профильтрованного через фильтр HEPA. Они также защищают оператора при помощи использования внутреннего рециркулированного воздуха. Они особенно подходят для обеспечения стерильной окружающей среды при работе со стерильными продуктами и для защиты оператора при работе с порошками.

Если это определено национальными регламентами, боксы биологической безопасности используют для любых видов работы с патогенными микроорганизмами и контаминированными порошками.

В боксах биологической безопасности не допускается использовать газовые горелки или прокаливатели проволоки. В случае необходимости газовую горелку применяют при условии создания маленького пламени, таким образом, чтобы не нарушить поток воздуха. Приемлемой альтернативой является использование одноразового оборудования (бактериологических петель, пипеток и т.д.)

5.2.2 Использование

В лабораториях используют боксы биологической безопасности, которые пригодны для конкретного исследования и с учетом условий окружающей среды.

Боксы не должны загромождаться оборудованием.

Все необходимое размещают до начала работы внутри бокса, чтобы свести к минимуму количество движений рук внутри и вне рабочей зоны. Расположение оборудования и материалов должно быть таким, чтобы свести к минимуму нарушение потока воздуха в рабочей зоне.

Операторы должны быть обучены правильному использованию боксов, чтобы обеспечивать как их безопасность, так и сохранность пробы или культуры микроорганизмов.

5.2.3 Очистка и дезинфекция

Рабочую зону очищают и обеззараживают после использования с помощью соответствующего, не обладающего коррозионными свойствами, дезинфицирующего средства, руководствуясь инструкцией изготовителя. Регулярно обследуют защитные префильтры проволочных сеток и вытирают их чистой, пропитанной дезинфицирующим средством, тканью.

Для ламинарных шкафов с очисткой воздуха наружную часть фильтра необходимо регулярно очищать под вакуумом таким образом, чтобы не повредить фильтрующий элемент.

Боксы биологической безопасности следует дезинфицировать перед заменой фильтра или плановым обслуживанием.

После очистки бокса для обеззараживания можно использовать ультрафиолетовые (УФ) лампы. УФ лампы регулярно очищают или заменяют в соответствии с инструкциями изготовителя. При их использовании они подлежат регулярной очистке с целью удаления пыли и грязи, которые могут повлиять на бактерицидную эффективность ультрафиолетового света. Необходимо проверять интенсивность ультрафиолетового излучения в процессе повторной сертификации бокса, чтобы гарантировать соответствие светового излучения лампы инструкциям изготовителя.

6 Подготовка стеклянной посуды и других лабораторных материалов

6.1 Подготовка

Стеклянная посуда и другие лабораторные материалы, используемые в микробиологии, должны иметь удобную конструкцию, использоваться должным образом и проходить соответствующую подготовку, чтобы гарантировать их чистоту и/или стерильность вплоть до момента использования. Для ополаскивания многократно используемой стеклянной посуды после промывания необходимо использовать воду лабораторной степени чистоты в соответствии с [50]. Проверку посуды на наличие остатков щелочи или кислоты можно проводить с использованием универсального индикаторного раствора. Значение pH должно быть в диапазоне 6,5 — 7,3.

Стеклянная посуда должна быть такой, чтобы предотвратить или ограничить контакт между оператором и инфекционным материалом.

Пробирки и флаконы должны быть закрыты соответствующими пробками. Если необходимо, стеклянная посуда, которая будет стерилизоваться (например, пипетки), должна быть помещена в специальные контейнеры или обернута в соответствующий материал (специальная бумага, алюминиевая фольга и т.д.). Для стеклянной посуды, которая стерилизуется в автоклаве пустой, следует обеспечить свободный доступ пара, иначе стерилизация не будет достигнута.

6.2 Стерилизация/деконтаминация

6.2.1 Общие положения

Необходимо регистрировать температуру и продолжительность стерилизации/деконтаминации. Могут быть использованы индикаторы стерилизации, которые способны различать стерильный и нестерильный материалы.

6.2.2 Стерилизация сухим теплом

Стеклянную посуду и т. п. стерилизуют в стерилизационном сушильном шкафу при температуре $(170 \pm 10) ^\circ\text{C}$ в течение не менее 1 ч или при аналогичном режиме.

6.2.3 Стерилизация влажным теплом

(паром) Стерилизация влажным паром под давлением является наиболее эффективным методом стерилизации лабораторной стеклянной посуды и других материалов. Температура в камере автоклава должна составлять $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ в течение не менее 15 мин (см. 5.6). 6.2.4 Деконтаминация с помощью химических реагентов Используют химические реагенты (например, вещества на основе хлора, спирты, четвертичные соединения аммония) в необходимых концентрациях и в течение необходимого времени воздействия.

Следует гарантировать, чтобы остатки химических веществ не влияли на жизнедеятельность микроорганизмов. 6.3 Одноразовое оборудование и материалы Одноразовое оборудование и материалы могут использоваться вместо оборудования и материалов многократного использования (стеклянной посуды, чашек Петри, пипеток, бутылок, пробирок, петель, шпателей и т.д.), если они аналогичны по техническим условиям.

Необходимо проверить, чтобы такое оборудование подходило для использования в микробиологии (в особенности, это касается его стерильности), и чтобы материал не содержал веществ, подавляющих рост микроорганизмов (см. [39]).

Контрольные вопросы

1. Что включает в себя производственный контроль?
2. Какую лицензию должны получать производственные микробиологические лаборатории молочных предприятий?
3. Какие группы микроорганизмов определяют в производственных лабораториях молочных предприятий?
4. Что должны обеспечить требования к помещениям производственных лабораторий молочных предприятий?
5. Для чего предназначены «чистая» и «заразная» зоны?
6. Как организован и для чего предназначен бокс?
7. Где проводятся работы с заквасочными микроорганизмами?
8. Перечислите правила техники безопасности работы в микробиологических лабораториях.

Практическое занятие 2

Методы микробиологических исследований пищевых продуктов

Цель: изучить основные методы микробиологических исследований пищевых продуктов

Теоретическое обоснование

ГОСТ ISO 7218—2015 «МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям»

9 Экспертиза (исследование) 9.1 Гигиенические меры предосторожности при проведении исследований

Чтобы избежать загрязнения окружающей среды и анализируемых проб микробиологические исследования проводят в отдельной комнате или зоне, или в боксе биологической безопасности.

До открывания обычных проб участок вокруг предполагаемого места открывания обрабатывают 70 %-ным (по объему) спиртом (или другим аналогичным продуктом) и дают ему испариться. Перед вскрытием стерильной упаковки погружают область предполагаемого места открывания в раствор, содержащий свободный хлор концентрацией 100 — 200 млн-1 (или в другой подходящий стерилизующий раствор) в течение не менее 10 мин, чтобы уничтожить микроорганизмы, которые могли бы заразить пробу.

Любой инструмент, который используют для открывания упаковки и извлечения пробы целиком или части пробы (консервный нож, ножницы, ложку, щипцы, пипетку и т. д.), необходимо стерилизовать.

Область, прилегающая к рабочему месту, должна быть вымыта соответствующим дезинфицирующим средством до начала исследования.

Непосредственно перед началом исследования необходимо вымыть руки, и если руки загрязнились во время исследования, то их необходимо вымыть во время исследования.

Все используемые инструменты должны быть стерильными и защищены от заражения до и в течение исследования.

Все приборы и используемые инструменты необходимо поместить в подходящий контейнер для последующей утилизации или стерилизации.

Необходимо соблюдать меры предосторожности и проводить работу, насколько это возможно, в стерильных условиях. Например: а) требуется удостовериться, что рабочая зона находится в чистом состоянии, а все возможные источники загрязнения удалены или сведены к минимуму, и отсутствуют сквозняки (то есть двери и окна закрыты). Следует избегать ненужных перемещений персонала во время исследования; б) перед началом и после работы необходимо провести обеззараживание рабочих поверхностей соответствующим дезинфицирующим средством; в) до начала работы следует убедиться, что все необходимые материалы и оборудование для выполнения работы являются доступными; г) работу необходимо выполнять без задержек; д) следует разделить «чистую» и «грязную» работу во времени и по месту выполнения (это особенно важно при работе с пробами высокого риска, такими как сырое мясо и сырые яйца); е) для работы обычно используют одноразовое оборудование; ж) если содержимое упаковки с одноразовыми пипетками, чашками Петри и другими необходимыми инструментами не используют полностью в процессе анализа, необходимо проследить, чтобы упаковка была надлежащим способом закрыта после изъятия необходимого количества инструментов; з) любой зараженный материал, попавший на поверхность рабочего места, немедленно обрабатывают с помощью ватных хлопковых тампонов или любого другого подходящего средства, пропитанного 70 %-ным (по объему) спиртом или любым другим подходящим дезинфицирующим средством. Затем рабочее место моют и дезинфицируют, после чего продолжают исследование; и) для продуктов, которые могут содержать патогенные бактерии, используют бокс биологической безопасности, если это оговаривается национальным регламентом; л) при извлечении стерильной пипетки из упаковки не позволяют наконечнику касаться наружных поверхностей пипеток, остающихся в упаковке, потому что такие поверхности могут стать причиной контаминации наконечника; м) пипетка не должна прикасаться к ободкам или горлышкам колб или флаконов, используемых для разведений.

Аэрозоли — главная причина загрязнения окружающей среды и инфекции. Например, аэрозоли могут формироваться следующим образом: - при открытии чашек Петри, пробирок и флаконов; - использовании шейкеров, шприцов, центрифуг и т. д.; - опорожнении пипеток; - стерилизации влажных петель и игл;

- открывании ампул, содержащих лиофилизированные культуры.

Таким образом, их формирование необходимо свести к минимуму.

При использовании молекулярных методов необходимо соблюдать дополнительные меры предосторожности в соответствии с ISO 22174.

9.2 Приготовление исходной суспензии и разведений

9.2.1 Общие положения Исходную суспензию и разведения приготавливают согласно соответствующей части ISO 6887. Интервал времени между моментом окончания приготовления исходной суспензии и моментом инокуляции посевного материала в питательную среду не должен превышать 45 мин, если он специально не оговаривается в соответствующем стандарте.

За этапом приготовления исходной суспензии и получения разведений может следовать этап обогащения в соответствии с конкретными стандартами.

9.2.2 Концентрирование 9.2.2.1 Центрифугирование или фильтрация с помощью мембранного фильтра Если требуется подсчет малого числа микроорганизмов, подсчет может быть улучшен как с точки зрения чувствительности, так и точности посредством введения дополнительного этапа концентрирования анализируемой пробы. Концентрация при этом может быть достигнута центрифугированием или фильтрацией на мембранных фильтрах.

При использовании центрифугирования полученный осадок повторно растворяют в меньшем объеме растворителя и продолжают исследование.

Для каждой рассматриваемой комбинации (пищевой продукт плюс микроорганизм) (см. например, [23]) необходимо предварительно установить, является ли введение этапа концентрирования необходимым и правомерным. Следует оценить способность к фильтрованию суспензии пищевого продукта.

Необходимо также проверить выполнение этапа концентрирования в отношении чувствительности, селективности, линейности и воспроизводимости. Если уровень загрязнения неизвестен, параллельно необходимо провести исследование стандартным методом (без фильтрации).

9.2.2.2 Иммуноразделение Если в пробе присутствуют малые количества интересующих микроорганизмов, разделение и концентрирования микроорганизмов может быть достигнута с помощью иммуномагнитных шариков, покрытых специфическими антителами.

Шарики распределяют, вместе с выделенными интересующими микроорганизмами, непосредственно на конкретной плотной питательной среде в соответствии с конкретными нормативными стандартами. Следует проверить, что иммуномагнитные шарики, покрытые специфическими, используемыми на этом этапе концентрирования антителами, удовлетворяют требованиям, определенным при оценочных испытаниях, проведенным согласно методам, опубликованным в международной научной литературе, касающейся, главным образом, микробиологии пищевых продуктов. Эта проверка особенно важна, если этот метод не был утвержден в соответствии с ISO 16140-2.

10 Подсчет 10.1 Общие положения При оценке микробиологического качества и/или безопасности пищевых продуктов и кормов для животных часто недостаточно только знать, какие микроорганизмы присутствуют в пробе. В большинстве случаев количественный аспект не менее важен, и это требует необходимости подсчета микроорганизмов. Подсчет можно выполнить различными способами: с помощью прямого определения (микроскопия), посевом на плотные или жидкие питательные среды, с помощью проточной цитометрии, в полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и т. д. Однако в настоящем стандарте рассматривается только подсчет микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах.

Подсчет на плотных питательных средах основан на способности многих микроорганизмов образовывать колонии на или в агаровых питательных средах, которые можно распознать невооруженным глазом или с помощью простой лупы.

Однако если матрица содержит много частиц, которые могут повлиять на обнаружение колоний, они должны быть предварительно отделены путем установки или использования рукавов с фильтром.

Если количество бактерий очень мало (менее 10 колоний в или на чашке при минимальном разбавлении), рекомендуется проводить подсчет с использованием жидких сред (например, НВЧ). С целью повышения статистической надежности результатов (см. приложения В и С) также могут быть использованы концентрирование посредством фильтрования, иммуносепарации или центрифугирования.

10.2 Подсчет при использовании плотных питательных сред 10.2.1 Общие положения Чашка Петри должна быть маркирована этикеткой, на которой указывают номер пробы, разведение, дату посева и другую необходимую информацию.

Необходимо выбрать определенные разведения, чтобы обеспечить получение определенного количества колоний на чашках (см. 10.3.1) и исключить возможные ингибирующие свойства.

Для переноса каждого разведения используют отдельную стерильную пипетку, кроме случаев, когда работу ведут от самого высокого разведения к самым низким разведениям.

П р и м е ч а н и е — Д а н н ы й подпункт приводится для общего случая разведения 10¹, но также допустимы и другие виды разведения (например, 1:5 и 1:2).

10.2.2 Количество чашек Петри на каждое разведение В процедуре подсчета в микробиологии пищевых продуктов обычно используют одну чашку на каждое разведение

микроорганизмов с проведением не менее двух последовательных разведений. С целью повышения надежности можно также использовать две чашки на одно разведение.

Если используют только одно разведение, то с целью повышения надежности результатов можно использовать две чашки сданным разведением согласно приложению D.

В лабораториях, которые не применяют принципы обеспечения качества, с целью повышения надежности результатов можно использовать две чашки с одним разведением согласно приложению D.

10.2.3 Методы разлива чашек Отбирают определенные объемы разведений для исследования, касаясь наконечником пипетки боковой стенки пробирки, чтобы удалить избыточную жидкость с внешней стороны пипетки. Приподнимают крышку стерильной чашки Петри так, чтобы была возможность внесения содержимого пипетки в чашку, после чего содержимое распределяют.

После переноса расплавленной агаровой среды из водяной бани, оттирают сухой флакон чистым полотенцем во избежание загрязнения чашек водой. Избегают циркуляции среды на внешней стороне контейнера или на внутренней стороне чашки в процессе ее наполнения. С целью исключить загрязнения среды флакон держат практически горизонтально. Также следует избегать опускания флакона в период между наполнениями. Выливают агаровую среду при температуре 44 °C — 47 °C в каждую чашку Петри (как правило, 18 — 20 см³ агара в чашку Петри диаметром 90 мм, или 45 — 50 см³ агара в чашку Петри диаметром 140 мм для того, чтобы слой среды составлял не менее 3 мм) в течение 15 мин инокуляции (чтобы исключить агрегирование колоний). Необходимо наливать расплавленную среду таким образом, чтобы избежать ее попадания непосредственно в инокулят (посевной материал). Расплавленную среду и инокулят немедленно тщательно перемешивают для получения равномерного распределения микроорганизмов в питательной среде, например, посредством плавных движений чашки взад-вперед, из стороны в сторону и круговых движений. Далее чашки помещают на холодную горизонтальную поверхность, чтобы дать время охладиться и затвердеть питательной среде (время затвердевания агара не должно превышать 10 мин).

Если в исследуемом продукте предполагается присутствие колоний (например, вида *Proteus*) с «ползучим» ростом, используют для исследования слой со стерильным «голодным» агаром или идентичной питательной средой, наносимые на затвердевший агар в чашки с посеянным материалом (как правило, 5 см³ агара в чашке Петри на 90 см³), чтобы предотвратить или свести к минимуму распространение такого «ползучего» роста.

10.2.4 Поверхностный посев

10.2.4.1 Общие положения Методы посева, предназначенные для получения только поверхностных колоний на агаровых чашках, имеют некоторые преимущества по сравнению с методом заливки в чашки для выращивания микроорганизмов внутри агара. Морфологию поверхностных колоний легко наблюдать, используя способности оператора различать различные виды колоний. Микроорганизмы не подвергаются действию высокой температуры расплавленной агаровой среды, поэтому количество колоний может быть выше. Используют предварительно заполненные агаровой средой чашки, толщина агарового слоя которых составляет не менее 3 мм. Слой агара должен быть ровным и не содержать пузырьков воздуха и поверхностной влаги.

Чтобы облегчить равномерное распределение, поверхность затвердевшего агара необходимо подсушить в соответствии с ISO 11133 или в соответствии с другим соответствующим стандартом. В таком случае посевной материал абсорбируют в течение 15 мин.

10.2.4.2 Метод посева с помощью шпателя С помощью стерильной пипетки инокулят жидкой пробы или исходной суспензии в случае других проб (обычно от 0,1 до 0,5 см³) переносят на агаровую среду в чашки Петри (диаметром 90 или 140 мм, соответственно). Данную процедуру повторяют для следующего десятичного разведения (колонии, подлежащие подсчету, тогда будут представлены в степени разбавления 10⁻² в случае материала жидкой пробы и 10⁻³ в случае материала другой пробы) и, при необходимости, повторяют дальнейшие десятичные разведения.

Если необходимо подсчитать незначительное количество микроорганизмов в определенных продуктах, предел обнаружения можно увеличить в десять раз посредством

анализа 1,0 см³ пробы в случае жидких продуктов и 1,0 см³ исходной суспензии в случае других продуктов. Для этой цели, 1,0 см³ посевного материала распределяют или по поверхности большой чашки Петри (диаметром 140 мм) или по поверхностям трех обычных чашек Петри (диаметром 90 мм). При использовании только одного разбавления подготавливают дубликаты, используя две большие чашки или шесть малых.

С помощью шпателя, изготовленного из стекла, пластмассы или стали (например, изготовленной из стекла палочки, изогнутой в форме хоккейной клюшки диаметром приблизительно 3,5 мм и длиной 20 см, изгибы выполнены под прямым углом на расстоянии 3 см от одного конца палочки и сплющены на концах с помощью нагревания), распределяют посевной материал, по возможности, быстро и равномерно по поверхности агара, не касаясь боковых стенок чашки Петри. Закрыв чашку крышкой, дают посевному материалу абсорбироваться в течение 15 мин при комнатной температуре.

В определенных случаях (как указано в соответствующем стандарте) посевной материал можно поместить на мембрану и потом распределить по среде, как описано выше.

10.2.4.3 Метод спирального нанесения материала 10.2.4.3.1 Общие положения Метод спирального нанесения посевного материала для определения уровня содержания микроорганизмов проверен в межлабораторных испытаниях молока и молочных продуктов и других пищевых продуктов.

Используемое оборудование — спиральный дозатор — описан в 5.24.

10.2.5 Термостатирование Если в соответствующих стандартах нет специальных оговорок, чашки после посева незамедлительно переворачивают и быстро помещают в термостат с установленной соответствующей температурой. Если происходит интенсивное обезвоживание (например, при 55 °C или в случае интенсивной циркуляции воздуха), чашки перед термостатированием неплотно укладывают в пластиковые пакеты или используют сходную систему равной эффективности.

Во время термостатирования неизбежно происходят незначительные колебания температуры, например, во время типичных операций загрузки и разгрузки термостата, но важно, чтобы такие периоды занимали минимальное время. Продолжительность таких операций рекомендуется отслеживать, чтобы не допустить их заметного влияния на результат.

В определенных обстоятельствах желательно поместить засеянные чашки в холодильник не более чем на 24 ч перед термостатированием. Если это используется, лаборатория должна гарантировать, что подобная практика не влияет на результат подсчета.

Обычно чашки Петри составляют друг на друга, не более шести штук в стопке при аэробной инкубации. Стопки следует ставить друг от друга и от стенок термостата на расстоянии не менее 25 мм. Однако в термостатах, оснащенных системой циркуляции воздуха, высота стопок может быть больше, а расстояние между ними меньше; однако в этом случае необходимо проверять равномерность распределения температуры в термостате.

После термостатирования чашки следует немедленно исследовать. Однако их можно хранить, если нет иных указаний в соответствующих стандартах, до 48 ч в холодильнике. Хранение в холодильнике допускается только в случаях, если показано, что оно не влияет на количество искомых микроорганизмов, внешний вид или последующую идентификацию колоний. Охлажденные чашки с некоторыми средами, содержащими индикаторные красители, рекомендуется привести в равновесие с условиями окружающей среды при комнатной температуре перед исследованием, чтобы обеспечить восстановление правильной окраски.

10.3 Расчеты и выражение результатов, полученных на плотных средах 10.3.1 Подсчет колоний После термостатирования, установленного соответствующим стандартом на конкретный метод испытания, посчитывают количество колоний (общее число колоний, число типичных колоний или предполагаемых колоний) на каждой чашке, содержащей не более 300 колоний (или другого количества, установленного соответствующим стандартом на конкретный метод испытания).

При подсчете типичных или предполагаемых колоний необходимо представить описание колоний, которое дано в соответствующем стандарте на конкретный метод испытания.

В определенных случаях подсчет колоний может быть затруднен (например, когда присутствуют распространяющие «ползучий рост» микроорганизмы). Такие сливные колонии рассматривают как отдельные колонии. Если менее четверти чашки заполнено таким сливным ростом, колонии подсчитывают на другой части чашки и рассчитывают посредством интерполяции теоретическое число, которое должно соответствовать числу микроорганизмов на всей чашке. Если сливной рост отмечается более чем на одной четверти чашки, то подсчет на такой чашке не проводится. Колонии сливных (распространяющихся) микроорганизмов, выросших в форме цепочек, рассматривают как одну колонию.

10.3.2 Обработка результатов 10.3.2.1 Общие положения 10.3.2.1.1 В этом подразделе рассматриваются общие случаи: - посев проводят на одной чашке Петри диаметром 90 мм для каждого разведения и выполняют, по меньшей мере, два последовательных разведения; - максимальное количество всех присутствующих колоний на чашке составляет 300; - максимальное общее число колоний (типичных и атипичных), присутствующих на чашке, при подсчете типичных или презумптивных колоний приблизительно равно 300 на чашку; - максимальное число типичных или презумптивных колоний равно 150 на чашку; - число презумптивных колоний, отобранных для идентификации или подтверждения (см. 10.3.2.3), в каждой выбранной чашке обычно равно 5.

Если используются чашки с другим диаметром, отличным от 90 мм, максимальное число колоний должно возрастать или уменьшаться пропорционально площади поверхности чашки (или мембраны).

10.3.2.2 Метод расчета: общий случай (подсчет общего количества колоний или типичных колоний) Для получения достоверного результата при подсчете колоний обычно считается необходимым, чтобы хотя бы в одной чашке содержалось не менее 10 колоний [общее число колоний, типичных колоний или колоний, соответствующих критериям идентификации (см. 10.3.2.3)].

Рассчитывают число N микроорганизмов, присутствующих в пробе, как средневзвешенное значение из двух подсчетов в последовательных разведениях по формуле

$$N = \frac{\Sigma C}{V \cdot 1,1 \cdot d}, \quad (1)$$

где ΣC — сумма колоний, подсчитанных на двух чашках, выбранных для подсчета из двух последовательных разведений, в которых хотя бы одна чашка содержит не менее 10 колоний;

V — объем посевного материала, внесенного в каждую чашку, см³;

d — коэффициент разведения, соответствующий первому выбранному разведению [$d = 1$, если выбран только неразведенный жидкий продукт (исследуемая проба без разбавления)].

10.4.2 Подсчет колоний дрожжей и плесеней Для подсчета берут чашки, содержащие от 10 до 150 колоний. Если флора микроорганизмов состоит преимущественно из плесеней, выбирают чашки, в которых количество колоний ближе к нижней границе интервала; если флора микроорганизмов состоит преимущественно из дрожжей, для подсчета выбирают чашки, в которых количество колоний ближе к верхней границе интервала.

Если идентичность колоний вызывает сомнения, исследуют живые препараты или окрашенные препараты клеток, не менее пяти колоний на образец, чтобы подтвердить, что бактерии отсутствуют. 10.5 Подсчет при использовании жидких сред 10.5.1 Принцип Пробы для анализа высевает в жидкую среду, предназначенную для поддержки роста конкретного микроорганизма или группы микроорганизмов и часто для подавления размножения прочих микроорганизмов.

Чтобы определить, происходит ли рост искомым микроорганизмов, можно использовать различные критерии, например, визуальное обследование помутнения, выделение газа, изменение цвета, последующее выделение микроорганизмов на селективной агаризованной среде в определенных условиях температуры и атмосферы инкубирования. Состав питательной среды и критерии для выявления различий положительного и отрицательного результата определены в соответствующих стандартах.

Используя подобный подход, каждый образец для анализа может быть описан только качественно, значение, т.е. результат оценивается как положительный или отрицательный. Чтобы установить количество присутствующих микроорганизмов, необходимо исследовать несколько проб для анализа, начальных суспензий и разведений и использовать статистические методы для определения наиболее вероятного числа (НВЧ). 10.5.2 Посев 10.5.2.1 Общие положения Если используют селективную питательную среду, добавление образца для анализа не должно уменьшать селективных свойств этой среды, тем самым способствуя росту прочих микроорганизмов. В большинстве стандартов информация о совместимости определенных образцов и жидкой среды описана в области их применения. Необходимо с осторожностью подходить к таким образцам, как специи, какао, бульон и т.д., поскольку они могут содержать подавляющие рост микроорганизмов вещества, в связи с чем требуют добавления нейтрализующих веществ, применения более высоких коэффициентов разведения, центрифугирования, фильтрования или иммуномагнитной сепарации для выделения искоемых микроорганизмов из образца, даже если это специально не оговорено в соответствующих стандартах. Несовместимость может также быть вызвана биологическим составом образца: сильно загрязненные от окружающей среды пробы, ферментированные продукты или продукты, содержащие пробиотики, очевидно представляют большие проблемы микробиологу-аналитику, чем пробы, которые содержат очень незначительное количество микроорганизмов. Для таких проблемных образцов рекомендуется выполнять эксперименты, используя контрольные микроорганизмы, чтобы подтвердить, что метод действительно подходит для анализа данного образца.

При использовании метода НВЧ при анализе твердых проб, в том числе порошкообразных, для подготовки исходной суспензии отбирают только одну пробу. Для анализа данной исходной суспензии используют аликвоты. 10.5.2.2 Проведение анализа Если в соответствующих стандартах нет иных указаний, объемы образцов для анализа, равные или меньше 1 см³, обычно добавляют к объему сред обычной концентрации, в 5 — 10 раз превышающему объем пробы для анализа. Пробы для анализа объемом от 1 см³ до 100 см³ обычно добавляют к равным объемам сред двойной концентрации.

Для объемов, превышающих 100 см³, допускается использовать более концентрированные среды. Для особых целей стерильную обезвоженную среду можно растворить в холодном (или предварительно нагретом до 30 °С) образце, подлежащем анализу.

Если нет иных указаний, время, прошедшее с момента приготовления первого разведения пробы и момента засева последней пробирки, многолуночного планшета или флакона, должно составлять менее 30 мин. 10.5.3 Выбор способа посева Сущность метода наиболее вероятного числа заключается в разбавлении пробы до такой степени, чтобы посевной материал не всегда содержал живые микроорганизмы. По «выходу», т. е. по количеству посевного материала, дающему рост в каждом разведении, будет оцениваться начальная концентрация бактерий в пробе. Чтобы получить оценку в широком диапазоне возможных концентраций, микробиологи используют серийные разведения, инкубируя в термостате по несколько пробирок (или чашек и пр.) каждого разведения. НВЧ микроорганизмов, присутствующих на уровне исходной пробы, и точность оценки можно рассчитать с помощью статистических методов на основе числа положительных и отрицательных пробирок, полученных после инкубации в термостате.

Осуществляют выбор НВЧ из различных существующих конфигураций в соответствии: - с ожидаемым числом микроорганизмов в анализируемой пробе, - требованиями регламентов, - требуемой точностью и - другими практическими соображениями.

10.5.4 Термостатирование Засеянные пробирки, колбы и флаконы инкубируют в термостате или в водяной бане. Многолуночные планшеты помещают в термостат.

Выбирают продолжительность и температуру инкубации, получив информацию в соответствующем стандарте на конкретный метод испытания, поскольку эти параметры зависят от типа рассматриваемого микроорганизма или группы микроорганизмов.

Для некоторых микроорганизмов может потребоваться термостатирование в два этапа или этап подтверждения. Для получения дополнительной информации см. соответствующие стандарты, но следует иметь в виду, что в этом случае возникают дополнительные трудности

с расчетом величины НВЧ (см. ссылку [52]). 10.5.5 Интерпретация результатов Критерии дифференциации положительных и отрицательных результатов различны для каждого типа микроорганизма или группы микроорганизмов и определяются в соответствующих стандартах. Используя эти критерии, подсчитывают и записывают число положительных результатов, полученных во всех образцах для анализа, взятых из одной лабораторной пробы. 10.5.6 Определение значений НВЧ Существует три различных способа определения значения НВЧ: вычисление по математическим формулам, сопоставление с таблицами НВЧ или применение специальных компьютерных программ. При условии, что эти методы основаны на одних и тех же статистических допущениях, все эти варианты в равной степени достоверны.

Практическое занятие 3

Методы определения молочнокислых бактерий

Цель: изучить основные методы определения молочнокислых бактерий

Теоретическое обоснование

ГОСТ 33951-2016 Молоко и молочная продукция. Методы определения молочнокислых микроорганизмов распространяется на молоко и молочную продукцию и устанавливает методы определения молочнокислых бактерий:

- посевом в стерильное молоко и подсчетом наиболее вероятного числа (НВЧ);
- посевом на или в твердые питательные среды и подсчетом КОЕ.

Молочнокислые бактерии: Грамположительные, неподвижные, неспорообразующие, каталазоотрицательные, нитрат-редуктаза-отрицательные и цитохром-оксидазоотрицательные, не разжижающие желатин и не продуцирующие индол кокки или прямые палочки. Примечание - Основные роды и виды молочнокислых бактерий в производстве молочных продуктов: вид *Lactococcus lactis*, род *Lactobacillus*, вид *Streptococcus thermophilus*, род *Leuconostoc*.

6.2 Приготовление питательных сред

6.2.1 Приготовление стерильного обезжиренного молока

Натуральное или восстановленное обезжиренное молоко разливают в пробирки по 10 см и затем стерилизуют при температуре $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (10 ± 1) мин.

Стерильное обезжиренное молоко допускается хранить при температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 30 дней.

6.2.2 Приготовление гидролизованного молока

Натуральное или восстановленное обезжиренное молоко кипятят или обрабатывают текучим паром в течение 20 мин, охлаждают до температуры $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ и устанавливают активную кислотность pH (7,6-7,8). К 1000 см молока добавляют (0,5-1,0) г порошка панкреатина и 5 см хлороформа. Колбу со смесью закрывают корковой пробкой и выдерживают в термостате при температуре 40°C в течение (18-24) ч. В течение первых (3-5) ч молоко несколько раз перемешивают (пробку после встряхивания приоткрывают для удаления паров хлороформа). Через (18-24) ч колбу вынимают из термостата, гидролизованное молоко фильтруют через бумажный фильтр, разводят дистиллированной водой в соотношении 1:1, устанавливают активную кислотность pH (7,0-7,2) и стерилизуют при температуре $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (15 ± 1) мин.

Гидролизованное молоко допускается хранить при температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 30 дней.

6.2.3 Приготовление агара с гидролизанным молоком или бульоном

К 1000 см гидролизованного молока (6.2.2) или гидролизованного бульона (6.2.3.1) добавляют 15 г агара. Смесь нагревают до полного расплавления агара, фильтруют через

вату и разливают в пробирки или колбы. Смесь стерилизуют при температуре $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (10 ± 1) мин.

8 Методы анализа Для определения количества лактококков и термофильных молочнокислых стрептококков посев проводят в жидкую питательную среду по 6.2.1 или агаризованные питательные среды по пп.6.2.3-6.2.5.

Для определения количества молочнокислых палочек посев проводят в жидкую среду по 6.2.1 или 6.2.6, 6.2.7.

Для определения количества *L. casei* (*L. casei* subsp. *casei* или *L. casei* subsp. *rhannosus*) в смешанных культурах с молочнокислыми палочками посев проводят в среду по 6.2.8.

8.1 Метод определения молочнокислых бактерий посевом в стерильное молоко и подсчета НВЧ

8.1.1 Сущность метода Метод основан на способности мезофильных молочнокислых бактерий развиваться в обезжиренном молоке при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$, а термофильных молочнокислых бактерий - при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, сбраживая лактозу до молочной кислоты и образуя сгусток в течение 72 ч. 8.1.2 Проведение анализа 8.1.2.1 Выбор разведений для посева Количество засеваемого продукта устанавливают с учетом наиболее вероятного содержания этих микроорганизмов в продукте. Как правило, для подсчета палочек используют пятое, шестое или седьмое разведение. Для подсчета стрептококков - седьмое или восьмое разведение. 8.1.2.2 Посев Из каждой пробы делают ряд последовательных разведений (до 10). По 1 см последних трех-четырех разведений вносят в две параллельные пробирки со стерильным обезжиренным молоком и помещают в термостат.

8.1.2.3 Культивирование Термостатирование чашек Петри осуществляют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (72 ± 3) ч в анаэробных условиях.

Термостатирование пробирок осуществляют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (72 ± 3) ч в аэробных условиях.

Пробирки с посевами инкубируют в течение 72 ч при: - температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ для подсчета мезофильных молочнокислых бактерий; - температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ для подсчета термофильных молочнокислых бактерий; - температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ для совместного подсчета мезофильных и термофильных молочнокислых бактерий.

Во время инкубирования молоко, содержащее молочнокислые бактерии, свертывается. Из сгустка готовят микроскопический препарат.

При определении количества молочнокислых палочек или молочнокислых стрептококков и палочек по микроскопическому препарату отмечают три последних разведения, в которых содержатся палочки или палочки со стрептококками. 8.1.3 Обработка результатов НВЧ микроорганизмов определяют по количеству пробирок с признаками роста.

Составляют числовую характеристику из трех цифр, указывающих число пробирок с признаками роста, где первая цифра соответствует разведению, при котором в двух пробирках есть признаки роста; следующие цифры - число пробирок с признаками роста в двух последующих разведениях. Выбор трех последовательных разведений для составления числовой характеристики желательно проводить так, чтобы в первом из выбранных разведений обе пробирки имели признаки роста, а в последнем разведении признаки роста в обеих пробирках отсутствовали.

По числовой характеристике определяют НВЧ (таблица 1), которое умножают на то разведение, с которого составляют числовую характеристику.

Полученное число соответствует статистически достоверному количеству клеток бактерий в 1 г или 1 см продукта.

Таблица 1

Числовая характеристика	НВЧ микробов при заражении двух параллельных пробирок
120	2,0
121	3,0
122	-
200	2,5
201	5,0
202	-
210	6,0
211	13,6
212	20,0
220	25,0
221	70,0
222	110,0

8.2 Метод определения молочнокислых бактерий посевом на/или в твердые питательные среды и их подсчета 8.2.1 Сущность метода Метод предназначен для определения молочнокислых бактерий в ферментированных молочных продуктах и основан на способности микроорганизмов расти на агаризованных селективных питательных средах

при высеве определенного их количества и (или) их разведений, культивировании посевов при оптимальных условиях, учете полученных результатов и, при необходимости, определении морфологических и биохимических свойств обнаруженных микроорганизмов и их подсчете. 8.2.2 Проведение анализа 8.2.2.1 Выбор разведений для посева Выбирают те разведения, при посеве которых на чашках Петри вырастает от 15 до 300 колоний.

8.2.2.2 Посев Для определения молочнокислых бактерий, кроме *L. casei* или *L. rhamnosus*, в две чашки Петри засевают по 1 см из трех последних разведений продукта. В каждую чашку Петри заливают по (12-15) см среды: - для учета количества лактококков и термофильных молочнокислых стрептококков - среды по пп.6.2.3-6.2.5; - для учета количества молочнокислых палочек - среда по пп.6.2.6, 6.2.7.

Для определения *L. casei* или *L. rhamnosus* в смешанной культуре с молочнокислыми палочками берут три чашки Петри с заранее подсушенной в термостате в течение 30 мин питательной средой (6.2.8). 1 см каждого разведения продукта наносят на поверхность среды и тщательно растирают шпателем Дригальского по поверхности. Чашки Петри переворачивают дном вверх и помещают в термостат. 8.2.2.3 Выращивание Чашки с посевами инкубируют в течение 72 ч при: - температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ для подсчета мезофильных молочнокислых бактерий; - температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ для подсчета термофильных молочнокислых бактерий; - температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ для совместного подсчета мезофильных и термофильных молочнокислых бактерий.

При определении количества *L. bulgaricus* и *S. thermophilus* в образцах йогурта чашки с посевами для подсчета *L. bulgaricus* термостатируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 72 ч в анаэробных условиях, *S. thermophilus* - при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48 ч.

При определении *L. casei* или *L. rhamnosus* чашки с посевами термостатируют при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (72 ± 3) ч.

8.2.3 Обработка результатов По окончании инкубации подсчитывают количество характерных колоний на чашке Петри. Если колонии имеют гетерогенный вид, делают микроскопические препараты нескольких колоний для подтверждения их принадлежности к конкретному виду: - *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* образует чечевицеобразные с четко очерченными краями колонии диаметром (1-3) мм на среде по 6.2.6; - *S. thermophilus* образует чечевицеобразные колонии диаметром (1-2) мм на среде по 6.2.5; - лактококки - образуют на поверхности питательной среды мелкие колонии диаметром до 1 мм, круглые, светлые; глубинные - чечевицеобразные; - *L. casei* или *L. rhamnosus* образуют мелкие круглые колонии на поверхности плотных питательных сред и вогнутые, иногда с выростами глубинные колонии по 6.2.8.

Для подтверждения результатов выбирают использованные при подсчете колонии и готовят микроскопический препарат по ГОСТ 32901 (8.7).

Характеристика микропрепарата *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* - палочки одиночные и в парах, цепочки палочек; Характеристика микропрепарата *S. thermophilus* - кокки, диплококк, длинные цепочки кокков; Характеристика микропрепарата *L. casei* или *L. rhamnosus* - мелкие тонкие палочки.

Количество микроорганизмов каждого вида определяют по формуле:

$$N = \frac{C}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d},$$

где N - количество микроорганизмов каждого вида в пробе, КОЕ/г;

Σ - сумма колоний, подсчитанных на чашках;

n_1 - количество чашек, соответствующих определяемому микроорганизму, подсчитанных в самом низком разведении;

n_2 - количество чашек, соответствующих определяемому микроорганизму, подсчитанных в самом высоком разведении;

d - число, соответствующее значению разведения для каждого вида микроорганизмов, для которого был произведен первый подсчет.

Общее количество молочнокислых бактерий в йогурте определяют путем суммирования количества *L. bulgaricus* и *S. thermophilus*.

Пример - Если в 10^{-5} разведении 295 и 245 колоний *L. bulgaricus* и в 10^{-6} разведении 33 и 40 колоний *L. bulgaricus*, то $N_1 = (295 + 245 + 33 + 40) / [(2 + 0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-5}] = 278,6 \cdot 10^5$; если в 10^{-5} разведении 280 и 240 колоний *S. thermophilus* и в 10^{-6} разведении 30 и 38 колоний *S. thermophilus*, то $N_2 = (280 + 240 + 30 + 38) / [(2 + 0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-6}] = 267,3 \cdot 10^6$; общее количество молочнокислых бактерий $N = N_1 + N_2 = 278,6 \cdot 10^5 + 267,3 \cdot 10^6 = 295,2 \cdot 10^6 = 3,0 \cdot 10^8$ КОЕ/см³.

Контрольные вопросы

1. Какие микроорганизмы называют молочнокислыми?
2. Какие питательные среды используют для количественного определения молочнокислых бактерий?
3. В каких условиях проводят инкубирование молочнокислых бактерий при количественном определении?
4. Как проводят количественный учет молочнокислых бактерий?

Практическое занятие 4

Методы определения бифидобактерий

Цель: изучить основные методы микробиологических исследований пищевых продуктов

Теоретическое обоснование

ГОСТ 33924-2016 Настоящий стандарт распространяется на молоко и молочную продукцию и устанавливает метод селективного подсчета бифидобактерий с использованием техники подсчета колоний при температуре 37°C в анаэробных условиях. бифидобактерии (*Bifidobacterium*): Грамположительные, неподвижные, неспорообразующие, каталазоотрицательные бактерии, которые имеют форму раздвоенной палочки и характеризуются облигатными анаэробными свойствами.

Примечания 1 Бифидобактерии являются хемоорганотрофами и сбраживают сахар, продуцируя уксусную и молочную кислоты в молярном соотношении 3:2.

Оптимальная температура их роста от 37°C до 41°C. Палочки располагаются поодиночке, парами, V-образно, цепочками, столбчатыми ячейками или розетками, иногда показывая вздутые кокковые формы. 2 Основные виды бифидобактерий: *B.bifidum*, *B.infantis*, *B.breve*, *B.longum*, *B.adolescentis*, *B.lactis* и др.

Для определения бифидобактерий в кисломолочных продуктах применяют следующие питательные среды: ГМК-1 с добавлением диклоксациллина, хлористого лития, хлористого цистеина; MRS с добавлением диклоксациллина, хлористого лития, хлористого цистеина; TOS-MUP; ОББ с добавлением диклоксациллина; среда Блаурокка с добавлением диклоксациллина. Допускается применение среды ОББ и среды Блаурокка с добавлением

неомицина.

Метод определения бифидобактерий в чистой культуре основан на высеве определенного количества продукта и (или) его разведения в агаризованные селективные питательные среды, культивировании посевов при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (72 ± 3) ч, учете результатов по подсчету типичных колоний. При необходимости подтверждения результатов подсчета проводят определение морфологических свойств учитываемых микроорганизмов. Количество засеваемого продукта устанавливают с учетом наиболее вероятного содержания этих микроорганизмов в продукте.

После завершения инкубации подсчитывают количество колоний на чашках Петри или пробирках. Для подсчета используют чашки, на которых выросло от 10 до 300 колоний, или пробирки, на которых выросло от 5 до 150 колоний.

Подсчету подлежат типичные для бифидобактерий колонии: - на плотных питательных средах (MRS, TOS и ОББ) - в виде "дисков" или "гречишных зерен"; - на полутвердых питательных средах (ГМК-1, Блаурокка) - в виде "гвоздиков", "вытянутых веретен", иногда в виде "полос", расположенных вдоль пробирки.

Подтверждение принадлежности образовавшихся типичных колоний к бифидобактериям проводят методом микроскопирования.

В микроскопическом препарате бифидобактерии имеют следующий вид: тонкие палочки различной конфигурации, изогнутые или утолщенные, частично разветвленные, одинарные или парами, расположенные в V-образной форме, в виде цепочек, часток параллельных клеток.

$$N = \frac{C}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d}, \quad (1)$$

где N - количество бифидобактерий в пробе, КОЕ/г;

C - сумма колоний, подсчитанных на чашках (пробирках);

n_1 - количество чашек (пробирок), подсчитанных в самом низком разведении;

n_2 - количество чашек (пробирок), подсчитанных в самом высоком разведении;

d - величина первого разведения, взятого для подсчета.

Пример - Если в 10^{-6} разведении 295 и 245 колоний и в 10^{-7} разведении 33 и 40 колоний, то $N = (295 + 245 + 33 + 40) / [(2 + 0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-6}] = 278,6 \cdot 10^6$

Контрольные вопросы

1. Какие общие свойства имеют бифидобактерии? На чем основаны методы их определения?
2. Какие общие свойства имеют питательные среды, применяемые для определения бифидобактерий? Чем они отличаются?
3. При каких условиях проводят инкубирование посевов при определении бифидобактерий? Почему?
4. По какой формуле определяют количество бифидобактерий?

Практическое занятие 5

Требования ГОСТ 34372-2017 «Закваски бактериальные для производства молочной

продукции»

Цель: изучить требования ГОСТ 34372-2017 «Закваски бактериальные для производства молочной продукции»

Теоретическое обоснование

ГОСТ 34372-2017 Закваски бактериальные для производства молочной продукции распространяется на закваски бактериальные и закваски бактериальные концентрированные (далее - БЗ и БК), представляющие собой жизнеспособные клетки молочнокислых, пропионовокислых, уксуснокислых и бифидобактерий, предназначенные для производства молочной продукции, а также приготовления производственной закваски.

В настоящем стандарте применены термины в соответствии с [1], а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 альтернативный фаготип: Совокупность штаммов, характеризующихся различной чувствительностью к типовому набору бактериофагов.

3.2 ароматообразующие БЗ и БК: Закваска, включающая заквасочные культуры, характеризующиеся ароматообразующей активностью.

3.3 бактериальная формула: Условное буквенное обозначение состава микрофлоры заквасок или концентрированных заквасок, включающее первые буквы родового, видового и подвидового названия на латинском языке.

3.4 бифидобактерии: Грамположительные, мезофильные или термофильные (в зависимости от вида), неподвижные, неспорообразующие, каталазоотрицательные палочки чрезвычайно вариабельной неправильной формы, характеризующиеся облигатными анаэробными свойствами. Конечные органические продукты метаболизма - уксусная и молочная кислоты.

3.5 газообразующие БЗ и БК: Закваска, включающая заквасочные культуры, характеризующиеся газообразующей активностью.

3.6 гетероферментативные бактерии: Микроорганизмы, которые в результате сбраживания глюкозы образуют кроме молочной кислоты много других продуктов, в том числе этиловый спирт, уксусную кислоту, углекислый газ и т.д.

Примечание - Основные роды и виды гетероферментативных молочнокислых бактерий в производстве молочных продуктов: род *Leuconostoc*, некоторые виды рода *Lactobacillus*, в том числе виды *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*.

3.7 гомоферментативные бактерии: Микроорганизмы, метаболизирующие не менее 95% глюкозы в молочную кислоту в результате процесса гликолиза.

Примечание - Основные роды гомоферментативных молочнокислых бактерий в производстве молочных продуктов: род *Lactococcus*, род *Streptococcus*, большая часть видов рода *Lactobacillus*.

3.8 единица активности; ЕА: Масса или объем БЗ или БК, содержащие количество жизнеспособных клеток заквасочных бактерий в БЗ не менее 10 КОЕ/г (см), в БК не менее 10 КОЕ/г (см) и имеющие кислотообразующую активность, регламентированные

требованиями

документов

изготовителя.

3.9 жидкие БЗ и БК: Культуры заквасочных микроорганизмов, при производстве которых исключена операция высушивания.

3.10 бактериальная закваска; БЗ: Культура непатогенных и нетоксигенных бактерий, состоящая из одного или нескольких видов и/или штаммов заквасочных микроорганизмов и содержащая жизнеспособных клеток не менее 10 КОЕ/г (см) для жидких и замороженных и не менее 10 КОЕ/г для сухих, предназначенная для производства молочной продукции.

3.11 закваска бактериальная концентрированная; БК: Культура непатогенных и нетоксигенных бактерий, состоящая из одного или нескольких видов и/или штаммов заквасочных микроорганизмов, жидкая, замороженная или сухая, содержащая жизнеспособных клеток не менее 10 КОЕ/г (см), предназначенная для производства молочной продукции.

3.12 замороженные БЗ и БК: Культуры заквасочных микроорганизмов, при производстве которых использована операция замораживания.

3.13 защитные БЗ и БК: Закваска, включающая заквасочные культуры, обладающие существенной антагонистической активностью относительно микроорганизмов порчи, соответствующие составу микрофлоры производимой молочной продукции и не искажающие ее органолептические показатели, регламентируемые соответствующим документом.

3.14 кислотообразующая активность: Значение активной кислотности и/или прирост титруемой кислотности при культивировании БЗ или БК в молоке, отвечающие требованиям технических документов изготовителя. Для БЗ или БК, состоящих из микроорганизмов с низким кислотообразованием, кислотообразующая активность не нормируется.

3.15 кислотообразующие БЗ и БК: Закваска, включающая заквасочные культуры, характеризующиеся кислотообразующей активностью.

3.16 мезофильные БЗ и БК: Закваска, включающая заквасочные культуры, имеющие температурный интервал жизнедеятельности от 10 до 45°C с оптимумом 20-36°C.

3.17 молочнокислые бактерии: Грамположительные, факультативно анаэробные, мезофильные или термофильные, неподвижные, неспорообразующие, каталазо-нитрат-редуктаза-цитохром-оксидазоотрицательные, не разжижающие желатин и не продуцирующие индол кокки или прямые палочки. Основной органический продукт метаболизма - молочная кислота.

Примечание - Основные роды и виды молочнокислых бактерий в производстве молочных продуктов: вид *Lactococcus lactis*, род *Lactobacillus*, вид *Streptococcus thermophilus*, род *Leuconostoc*.

3.18 мезофильно-термофильные БЗ и БК: Закваска, включающая как мезофильные, так и термофильные заквасочные культуры.

3.19 многоштаммовые БЗ и БК: Закваска, состоящая из нескольких штаммов определенного вида (подвида) заквасочных микроорганизмов, входящих в состав закваски.

3.20 моновидовые БЗ и БК: Закваска, состоящая из одного вида (подвида) заквасочных микроорганизмов.

3.21 одноштаммовые БЗ и БК: Закваска, состоящая из одного штамма определенного вида (подвида) заквасочных микроорганизмов, входящих в состав закваски.

3.22 поливидовые БЗ и БК: Закваска, состоящая из двух и более видов (подвидов) микроорганизмов.

3.23 пробиотические БЗ и БК: Закваска, включающая заквасочные культуры, характеризующиеся пробиотической активностью.

3.24 пропионовокислые бактерии: Грамположительные, факультативно анаэробные, мезофильные, неподвижные, неспорообразующие, каталазоположительные палочки неправильной формы (встречаются кокковидные формы). Конечные органические продукты метаболизма - пропионовая и уксусная кислоты.

3.25 ротация: Система смены БЗ и БК с одинаковым или близким видовым составом, предполагающая периодичность использования штаммов одного вида с альтернативным фаготипом.

3.26 сухие БЗ и БК: Культуры заквасочных микроорганизмов, при производстве которых применяется операция лиофильной, или распылительной, или иной сушки.

3.27 термофильные БЗ и БК: Закваска, включающая заквасочные культуры, имеющие температурный интервал жизнедеятельности от 10 до 60°C с оптимумом 37-46°C.

3.28 уксуснокислые бактерии: Грамотрицательные, аэробные, мезофильные, неспорообразующие, палочковидные прямые и слегка изогнутые клетки. Конечный органический продукт метаболизма - уксусная кислота.

3.29 фагоальтернативные БЗ и БК: Закваска с одинаковым видовым составом, включающим штаммы с альтернативным фаготипом.

3.30 цитратсбраживающие бактерии: Микроорганизмы, способные преобразовывать цитраты (соли лимонной кислоты) в диацетил и ацетоин с выделением углекислого газа и составляющие газоароматообразующую микрофлору БЗ и БК, формирующую диацетильный вкус в молочной продукции и рисунок в сырах.

Примечание - Основной роды и виды цитратсбраживающих бактерий в производстве молочных продуктов: вид *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis*, род *Leuconostoc*.

БЗ и БК в зависимости от физического состояния и способа производства подразделяют:

- на жидкие;
- замороженные;
- сухие.

БЗ и БК в зависимости от числа входящих в их состав видов микроорганизмов подразделяют:

- на моновидовые;
- поливидовые.

БЗ и БК в зависимости от количества входящих штаммов каждого вида подразделяют:

- на одноштаммовые;
- многоштаммовые.

БЗ и БК в зависимости от температурных интервалов развития входящих в их состав видов подразделяют:

- на мезофильные;
- термофильные;
- мезофильно-термофильные.

По органолептическим и физико-химическим показателям БЗ и БК должны соответствовать требованиям, указанным в таблице 1.

Таблица 1

Наименование показателя	Характеристика и норма для БЗ и БК		
	жидких	замороженных	сухих
Внешний вид	Однородная жидкость	Однородная замороженная масса и/или гранулы различной формы и размеров	Порошкообразная масса, и/или гранулы различной формы и размеров, и/или таблетки
Цвет	От светло-кремового до светло-коричневого или цвет наполнителя		
Массовая доля влаги, %	-	-	От 2 до 6

Основной состав микрофлоры, используемой в БЗ или БК для производства молочной продукции, представлен в таблице 2.

Группы микроорганизмов в составе заквасок	Заквасочная культура			Бактериальная формула
	Род	Вид	Подвид	
Лактококки	Lactococcus	lactis	lactis	LcLL
	Lactococcus	lactis	diacetylactis	LcLD
	Lactococcus	lactis	cremoris	LcLC
Лейконостоки	Leuconostoc	lactis	-	LeuL
	Leuconostoc	mesenteroides	cremoris	LeuMC
	Leuconostoc	mesenteroides	mesenteroides	LeuMM
	Leuconostoc	mesenteroides	dextranicum	LeuMD
	Leuconostoc	pseudomesenteroides	-	LeuP
Мезофильные молочнокислые палочки	Lactobacillus	brevis	-	LbBr
	Lactobacillus	buchneri	-	LbBu
	Lactobacillus	casei	-	LbCas
	Lactobacillus	paracasei	paracasei	LbPP
	Lactobacillus	pentosus	-	LbPe
	Lactobacillus	plantarum	-	LbPI
	Lactobacillus	paraplantarum	-	LbPa
	Lactobacillus	kefiri	-	LbKef
Термофильные молочнокислые палочки	Lactobacillus	acidophilus	-	LbA
	Lactobacillus	delbrueckii	delbrueckii	LbDD
	Lactobacillus	delbrueckii	bulgaricus	LbDB

	Lactobacillus	delbrueckii	lactis	LbDL
	Lactobacillus	fermentum	-	LbF
	Lactobacillus	gasseri	-	LbG
	Lactobacillus	helveticus	-	LbH
	Lactobacillus	reuteri	-	LbReu
	Lactobacillus	jensenii	-	LbJe
Мезофильно-термофильные молочнокислые палочки	Lactobacillus	jonsonii	-	LbJo
	Lactobacillus	rhamnosus	-	LbR
Термофильный молочнокислый стрептококк	Streptococcus	salivarius	thermophilus	StST
Бифидобактерии	Bifidobacterium	adolescentis	-	BfAd
	Bifidobacterium	animalis	-	BfAn
	Bifidobacterium	bifidum	-	BfBf
	Bifidobacterium	breve	-	BfBr
	Bifidobacterium	infantis	-	Bfl
	Bifidobacterium	lactis	-	BfL
	Bifidobacterium	longum	-	BfLo
Уксуснокислые бактерии	Acetobacter	aceti	-	AA
	Acetobacter	pasteurians	-	AP
Пропионовокислые бактерии	Propionibacterium	freudenreichii	freudenreichii	PrFF
	Propionibacterium	freudenreichii	shermani	PrFS
	Propionibacterium	freudenreichii	globosum	PrFG

Характеристика основных видов заквасочных микроорганизмов приведена в таблице 3.

Таблица 3

Вид микроорганизмов, входящих в состав микрофлоры БЗ и БК	Характеристики	Температурные характеристики, °C	Предельная кислотность, °T
Lc. lactis subsp. lactis	Гомоферментативные, факультативно анаэробные, мезофильные, грамположительные кокки. Кислотообразующий компонент закваски	Интервал роста от 8 до 42, оптимум 28-32	95-140
Lc. lactis subsp. cremoris	Гомоферментативные, факультативно анаэробные, мезофильные, грамположительные кокки. Преимущественно кислотообразующий компонент закваски	Интервал роста от 8 до 40, оптимум 22-30	95-130
Lc. lactis subsp.	Гомоферментативные,	Интервал роста от	70-120

diacetylactis	цитратсбраживающие, факультативно анаэробные, мезофильные, грамположительные кокки. Кислотообразующий компонент закваски, обладающий газоароматообразующей активностью	8 до 42, оптимум 28-32	
Leuconoctoc	Гетероферментативные, факультативно анаэробные, мезофильные, грамположительные кокки. Газоароматообразующий компонент закваски	Интервал роста от 8 до 39, оптимум 20-30	40-80
Streptococcus thermophilus	Гомоферментативные, факультативно анаэробные, термофильные, грамположительные кокки. Кислотообразующий компонент	Интервал роста от 5 до 55, оптимум 40-46	100-140
Lactobacillus plantarum	Гомоферментативные, факультативно анаэробные, мезофильные, грамположительные, неспорообразующие палочки правильной формы. Преимущественно антагонисты микроорганизмов порчи, пробиотики	Интервал роста от 10 до 45, оптимум 30-32	100-220
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus	Гомоферментативные, факультативно анаэробные, термофильные, грамположительные, неспорообразующие палочки правильной формы. Кислотообразующий компонент	Интервал роста от 0 до 55, оптимум 40-45	160-350
Lactobacillus casei	Гомоферментативные, факультативно анаэробные, мезофильные, грамположительные, неспорообразующие палочки правильной формы. Обладают протеолитическими свойствами и ускоряют процессы созревания сыров, пробиотики	Интервал роста от 10 до 45, оптимум 30-32	100-220
Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis	Гомоферментативные, факультативно анаэробные, термофильные, грамположительные, неспорообразующие палочки правильной формы.	Интервал роста от 15 до 52, оптимум 40-44	120-250

	Кислотообразующий компонент		
Lactobacillus helveticus	Гомоферментативные, факультативно анаэробные, термофильные, грамположительные, неспорообразующие палочки правильной формы. Кислотообразующий компонент	Интервал роста от 15 до 52, оптимум 40-44	160-350
Lactobacillus acidophilus	Гомоферментативные, факультативно анаэробные, термофильные, грамположительные, неспорообразующие палочки правильной формы. Кислотообразующий компонент закваски, пробиотики	Интервал роста от 20 до 55, оптимум 37-45	180-300
Bifidobacterium	Облигатно-анаэробные, грамположительные, неспорообразующие палочки неправильной формы. Пробиотики	Интервал роста от 20 до 50, оптимум 36-38	40-130
Propionibacterium	Гетероферментативные, факультативно анаэробные, мезофильные, грамположительные, неспорообразующие короткие, иногда кокковидные палочки. Газо-ароматообразователи	Интервал роста от 15 до 40, оптимум 22-30	80-170
Acetobacter	Гомоферментативные, грамотрицательные, мезофильные, аэробные палочки	Интервал роста от 15 до 40, оптимум 25-30	-

Основные показатели БЗ и БК, оцениваемые при входном контроле, приведены в таблице 4.

Таблица 4

Наименование контролируемого показателя	Рекомендуемый порядок контроля
Показатели микробиологической безопасности	При входном контроле каждой партии по сопроводительным документам на соответствие показателям согласно требованиям [1], в сомнительных или спорных случаях в аттестованных микробиологических лабораториях
Видовой состав	При входном контроле каждой партии по сопроводительным документам на соответствие показателям согласно документам на БЗ или БК и/или требованиям документов, по которым изготавливается молочная продукция
Количество жизнеспособных клеток заквасочных	При входном контроле каждой партии по сопроводительным документам и/или посевом по ГОСТ

микроорганизмов	33951 на соответствие требованиям [1]
Кислотообразующая активность: - прирост титруемой кислотности, °Т; - снижение активной кислотности, ед. рН; - время сквашивания	При входном контроле для уточнения норм расхода, зависящих от свойств молока, используемого для производства молочной продукции на соответствие показателям согласно документам на соответствующие БЗ и БК и с использованием методов, описанных в пункте 9.5 данного стандарта
Количество жизнеспособных клеток отдельных групп заквасочных микроорганизмов, входящих в состав БЗ или БК	При входном контроле: - для оценки соответствия состава микрофлоры согласно документам на соответствующие БЗ и БК; - при подборе закваски для выработки того или иного молочного продукта на соответствие требованиям документа, по которому он изготавливается; - для прогнозирования пороков и корректировки технологических режимов. Посевы для выявления конкретных групп микроорганизмов и подсчет их количества проводят с использованием методов, описанных в пункте 9.6 данного стандарта

Примеры этикетной надписи

Приложение В (рекомендуемое)

Знак обращения на рынке	Наименование предприятия-изготовителя или организации, уполномоченной изготовителем на принятие претензий от потребителей Адрес Тел/факс	Товарный знак (торговая марка) (при наличии)
ЗАКВАСКА БАКТЕРИАЛЬНАЯ КОНЦЕНТРИРОВАННАЯ СУХАЯ БК-УГЛИЧ-С ГОСТ Область применения: для производства сыров и творога Состав: <i>L. lactis</i> , <i>L. cremoris</i> , <i>L. diacetylactis</i> или LCD Количество единиц активности: 1 ЕА Масса нетто - 1 г N партии Условия хранения: Дата изготовления: число, месяц, год Годен до: число, месяц, год После вскрытия упаковки концентрат хранению не подлежит Не содержит ГМИ		

Определение показателей микробиологической безопасности

Определение бактерий группы кишечных палочек проводят по ГОСТ 32901 и другим нормативным документам государства, принявшего стандарт.

Определение наличия дрожжей и плесневых грибов - по ГОСТ 33566.

Определение *Staphylococcus aureus* - по ГОСТ 30347.

Определение патогенных микроорганизмов, в том числе сальмонелл, - по ГОСТ 31659.

Кислотообразующую активность БЗ и БК определяют по нарастанию титруемой кислотности или по изменению активной кислотности.

Определение состава микрофлоры

Определение молочнокислых бактерий проводят по ГОСТ 33951.

Допускается при слабом росте термофильных молочнокислых микроорганизмов в термофильных БЗ и БК увеличивать температуру культивирования до $(41\pm 1)^\circ\text{C}$.

При необходимости учета количества термофильных молочнокислых микроорганизмов в мезофильно-термофильных БЗ и БК температура культивирования составляет $(45\pm 1)^\circ\text{C}$.

Определение бифидобактерий в БЗ и БК проводят по ГОСТ 33924.

Для определения пропионовокислых бактерий используют плотную питательную среду приготовленную следующим образом. В 1 дм воды вносят 30 г пептона, 1 г дрожжевого автолизата, 10 г агара; смесь тщательно перемешивают и кипятят до расплавления агара, не допуская пригорания. Затем добавляют 20 см раствора молочной кислоты массовой долей 40%. В полученной среде корректируют активную кислотность раствором гидроокиси натрия массовой долей 20% до значения $(7,1\pm 0,1)$ ед. рН. Среду разливают в пробирки, закрывают ватными пробками и стерилизуют при температуре $(121\pm 2)^\circ\text{C}$ в течение (15 ± 1) мин.

Допускается использование среды ГМК-1 по ГОСТ 33924.

При проведении посева необходимо соблюдать анаэробные условия, проводя посев "в высокий столбик", избегать взбалтывания среды и попадания внутрь столбика среды воздуха из пипетки. Допускается проводить посев на чашки Петри с использованием анаэроостата и газпакетов для создания анаэробных условий.

Количество засеваемых БЗ или БК устанавливают с учетом наиболее вероятного содержания пропионовокислых бактерий.

После застывания агара пробирки с посевами помещают в термостат температурой $(30\pm 1)^\circ\text{C}$ на 5-7 сут.

По окончании инкубирования учитывают последние пробирки, в которых выросли типичные для пропионовокислых бактерий колонии - в виде крупных "дисков" или "гречишных зерен", обычно светло-кремового цвета. Колонии могут быть белыми, серыми, розовыми, красными, желтыми или оранжевыми.

Подтверждение принадлежности образовавшихся типичных колоний к пропионовокислым бактериям проводят методом микроскопирования по ГОСТ 32901.

Определение количества уксуснокислых бактерий

Метод основан на появлении признаков роста уксуснокислых бактерий в виде поверхностной пленки на гидролизованном бульоне при температуре $(30\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48-72 ч. Для определения уксуснокислых бактерий используют гидролизированный бульон по ГОСТ 33951 (пункт 6.2.3), активная кислотность которого равна $(4,3\pm 0,2)$ ед. рН.

Гидролизированный бульон разливают в пробирки по 10 см, закрывают ватными пробками и стерилизуют при температуре $(121\pm 2)^\circ\text{C}$ в течение (15 ± 1) мин.

Количество засеваемых БЗ или БК устанавливают с учетом наиболее вероятного содержания уксуснокислых бактерий.

Из приготовленных разведений берут пипеткой по 1 см и вносят в два ряда пробирок с гидролизированным бульоном.

Посевы инкубируют при температуре $(30\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48-72 ч.

Учитывают пробирки, в которых на поверхности бульона имеется пленка. Если пленка опускается на дно пробирки, то на стенке остается хорошо заметный след.

Результаты получают подсчетом наиболее вероятного числа (НВЧ).

При производстве молочной продукции конкретные БЗ и БК применяют в соответствии с

рекомендациями изготовителей заквасок путем:

- прямого внесения в молоко или смесь для выработки продукта;
- предварительной активизации для последующего внесения в молоко или смесь для выработки продукта;
- приготовления производственной закваски.

Библиография

- [1] Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 033/2013 "О безопасности молока и молочной продукции" (принят решением Совета Евразийской экономической комиссии от 9 октября 2013 г. N 67)
- [2] Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 "О безопасности пищевой продукции" (утвержден решением Комиссии Таможенного союза от 9 декабря 2011 г. N 880)
- [3] Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 022/2011 "Пищевая продукция в части ее маркировки" (утвержден решением Комиссии Таможенного союза от 9 декабря 2011 г. N 881)
- [4] Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 005/2011 "О безопасности упаковки" (утвержден решением Комиссии Таможенного союза от 16 августа 2011 г. N 769)

Практическое занятие 6

Методы определения возбудителей порчи пищевых продуктов

Цель: изучить основные методы определения возбудителей порчи пищевых продуктов

Теоретическое обоснование

В производственных лабораториях предприятий молочной промышленности микробиологические анализы для выявления микроорганизмов порчи выполняются в соответствии со следующими стандартами:

- ГОСТ 33566-2015 «Молоко и молочные продукты. Определение дрожжей и плесневых грибов»;
- ГОСТ 10444.12-2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчёта количества дрожжей и плесневых грибов»;
- ГОСТ 30706-2000 «Продукты молочные для детей. Метод определения количества дрожжей и плесневых грибов»;
- ГОСТ ISO 6611-2013 «Молоко и молочные продукты. Подсчет колониеобразующих единиц дрожжей и/или плесневых грибов. Методика определения количества колоний при температуре 25 °C»;
- ГОСТ 28805-90 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества осмоотolerантных дрожжей и плесневых грибов».

ГОСТ 33566-2015 «Молоко и молочные продукты. Определение дрожжей и плесневых грибов» использует следующие термины с соответствующими определениями: Дрожжи: гетерогенная группа одноклеточных эукариотических грибов, не имеющих мицелия или реже образующих псевдомицелий и существующих в виде отдельных клеток, для которых типичным способом размножения является почкование. Плесневые грибы: микроскопические эукариотические многоклеточные организмы, образующие вегетативные нити - гифы без перегородок или септированные на клетки. Гифы объединяются в мицелий - "вегетативное" тело гриба. На поверхности находятся органы размножения, содержащие огромное количество спор круглой или овальной формы. Диаметр гиф - от 5 до 50 мкм. Клетки имеют четко дифференцированное ядро.

Метод основан на способности дрожжей и плесневых грибов, содержащихся в молоке и молочной продукции, независимо от их видовой и групповой принадлежности, при посеве продукта либо его разведений на плотную питательную среду образовывать видимые характерные колонии через 3-5 сут при температуре $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ или $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$.

5.3.1 Приготовление питательной среды Сабуро 70,0 г сухой среды, состоящей из 40,0 г глюкозы, 12,0 г пептона или сухого гидролизата молочных белков, 18,0 г микробиологического агара, вносят в 1 дм дистиллированной воды и оставляют на 30 мин

для набухания. Среду при помешивании нагревают до полного расплавления агара, не допуская пригорания. В полученной среде проверяют активную кислотность и при необходимости корректируют ее раствором гидроокиси натрия массовой долей от 20% до 30% или раствором молочной кислоты объемной долей 20% до значения активной кислотности ($5,8 \pm 0,1$) ед. рН, разливают в колбы и стерилизуют при температуре 112°C и давлении 0,5 атм в течение 30 мин или при температуре $(121 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин.

5.3.2 Приготовление агаровой среды для определения дрожжей и плесневых грибов 60,0 г сухой агаровой среды для определения дрожжей и плесневых грибов, состоящей из 18,0 г сухой осветленной молочной сыворотки, 18,0 г лактозы и 24,0 г микробиологического агара, вносят в 1 дм дистиллированной воды, нагревают до полного растворения, при наличии осадка фильтруют. В полученной среде проверяют активную кислотность и при необходимости корректируют ее раствором гидроокиси натрия массовой долей от 20% до 30% или раствором молочной кислоты объемной долей 20% до значения активной кислотности 4,6-4,7 ед. рН, разливают в пробирки или колбы и стерилизуют 15 мин при температуре 121°C .

5.3.3 Приготовление растворов антибиотиков 5.3.3.1 Для повышения селективности питательных сред при выявлении и определении дрожжей и плесневых грибов используются антибиотики, подавляющие развитие бактерий при посеве молочных продуктов, содержащих смешанную микрофлору.

При выборе антибиотиков исходят из следующих положений: - антибиотик должен обладать максимально широким спектром действия относительно всех групп бактерий и не оказывать влияния на развитие дрожжей и плесневых грибов в используемых концентрациях; - быть полностью растворимым в воде; - по возможности обладать термо- и кислотоустойчивостью; - быть доступным для приобретения в аптечной сети.

5.3.4.1 Растворы антибиотиков заданной массовой концентрации готовят непосредственно перед использованием.

Растворы антибиотиков добавляют к питательным средам, подготовленным по 5.3.1 и 5.3.2, как до стерилизации, так и к расплавленным и охлажденным до температуры $(46 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ питательным средам после их стерилизации.

Раствор антибиотика окситетрациклина следует вносить только после стерилизации питательных сред.

Раствор антибиотика левомецетина следует вносить только перед стерилизацией питательных сред.

5.3.4.2 Определение дрожжей и плесневых грибов в молоке и молочной продукции на среде Сабуро проводят с обязательным использованием антибиотиков. 5.3.4.3 Определение дрожжей и плесневых грибов в молоке и молочной продукции на агаровой среде для определения дрожжей и плесневых грибов проводят с использованием антибиотиков.

Допускается определение дрожжей и плесневых грибов в молоке и молочной продукции на агаровой среде для определения дрожжей и плесневых грибов без использования антибиотиков. При этом предусматривается обязательная визуальная оценка выросших на чашке колоний и, в случае сомнения, микроскопирование.

Для определения дрожжей и плесневых грибов в молочной продукции необходимо выбирать разведения согласно положениям таблицы 2.

Таблица 2 - Засеваемые разведения для определения содержания дрожжей и плесневых грибов в молочной продукции (примеры)

Наименование продукта	Количество дрожжей (Д) и плесневых грибов (П), КОЕ/см ³ (г), не более	Засеваемые разведения
Продукты кисломолочные, продукты на их основе со сроком годности более 72 ч	Д - 50 П - 50	0, I
Сметана, продукты на ее основе, в том числе с компонентами со сроком годности более 72 ч	Д - 50 П - 50	I
Термически обработанные сквашенные молочные и молочные составные продукты	Д - 50 П - 50	I
Творог без компонентов (кроме произведенного с использованием ультрафильтрации, сепарирования, зерненного творога):		
- со сроком годности более 72 ч	Д - 100 П - 50	I
- замороженный	Д - 100 П - 50	I
Творог, произведенный с использованием ультрафильтрации, сепарирования со сроком годности более 72 ч	Д - 50 П - 50	I

Посевы продукта или соответствующих его разведений проводят на чашки Петри, проводят два параллельных определения.

На дно стерильной чашки Петри пипеткой вносят 1 см продукта или его разведения и стерильно заливают 15-20 см питательной среды Сабуро по 5.3.1 или агаровой средой для определения дрожжей и плесневых грибов, приготовленной по 5.3.2.

Чашки Петри с посевами ставят для застывания на горизонтальную поверхность. Затем чашки Петри переворачивают крышками вниз и ставят в термостат температурой $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 5 сут или при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 3-5 сут.

5.5.1 Подсчет дрожжей и плесневых грибов Каждую чашку помещают вверх дном и проводят, используя лупу, подсчет количества выросших колоний, считая отдельно колонии дрожжей и плесневых грибов. Каждую подсчитанную колонию отмечают на дне чашки.

При посеве продукта или его разведения на агаровую среду для определения дрожжей и плесневых грибов без антибиотиков на чашке могут вырасти мелкие пылевидные колонии бактерий или мелкие точечные колонии споровых аэробных бактерий. Крайне мелкие колонии бактерий, независимо от их видовой принадлежности, визуально отличаются от крупных или среднего размера колоний дрожжей и плесневых грибов.

На плотных питательных средах дрожжи образуют поверхностные, крупные, выпуклые, блестящие, серовато-белые либо окрашенные (оттенки желтого и красного цвета) колонии сметанообразной консистенции с гладкой поверхностью и ровным краем или глубинные, среднего размера колонии в виде звездочек и лодочек.

Плесневые грибы образуют крупные, поверхностные колонии, покрытые пушистым мицелием разной окраски (белой, желтой, розовой, зеленой, черной и т.д.).

Подсчету подлежат только колонии, характерные для дрожжей и плесневых грибов. Картина роста дрожжей и плесневых грибов представлена в приложении А.

При подсчете дрожжей и плесневых грибов для подтверждения полученных результатов проводят микроскопирование выбранных колоний в соответствии с ГОСТ 32901.

Картина микропрепаратов дрожжей и плесневых грибов представлена в приложении Б.

Клетки дрожжей имеют яйцевидную, округлую или продолговатую форму, размерами $(1,5-10,0) \times (2,5-30)$ мкм.

В микропрепаратах плесневые грибы видны в виде гифов размером от 5,0 до 50,0 мкм, либо гифов, несущих плодовые тела, - споры круглой, овальной или продолговатой формы.

Подсчету подлежат чашки с количеством выросших колоний дрожжей от 5 до 150 и плесневых грибов от 5 до 50. 5.5.2 Расчет количества дрожжей и плесневых грибов Количество дрожжей и плесневых грибов N, КОЕ/г (см³) продукта, вычисляют по формуле

$$N = \frac{c}{V \cdot d},$$

где c - количество колоний, подсчитанных на чашке, КОЕ;

V - объем посевного материала, см³;

d - выбранное разведение (коэффициент разбавления).

За окончательный результат анализа принимают среднеарифметическое значение результатов определений в соответствии с ГОСТ 32901 или средневзвешенное значение результатов определений в соответствии с ГОСТ ISO 7218, полученное по всем чашкам. При расчете средневзвешенного значения следует выполнять посев в двукратной повторности.

Чашки, на которых выявлено менее пяти колоний дрожжей и плесневых грибов, принимают во внимание для подтверждения наличия роста данных групп микроорганизмов в продукте или соответствующем его разведении.

Результат выражают в записи: менее 5×10^d КОЕ/г(см³), где d - число десятикратных разведений.



Рисунок А.2 - Рост плесневых грибов на агаровой среде для определения дрожжей и плесневых грибов

Практическое занятие 7

Методы определения патогенных микроорганизмов, вызывающих алиментарные заболевания

Цель: изучить основные методы микробиологических исследований пищевых продуктов

Теоретическое обоснование

Все патогенные микроорганизмы условно делятся на возбудителей пищевых отравлений (ПО) и возбудителей пищевых инфекций (ПИ). Основные отличия этих заболеваний:

- заразность (ПИ заразны, могут вызывать эпидемии, ПО не передаются);
- пути распространения (ПО возникают только при употреблении пищи, ПИ также могут распространяться через воду, воздух, контактно-бытовым путем);
- размножение возбудителей в пищевых продуктах (ПО связаны с интенсивным размножением микробов, возбудители ПИ как правило, в них не размножаются, а сохраняют жизнеспособность и вирулентность);
- концентрация микробов, при которой возникает заболевание (инфицирующая доза, ПО при значительных концентрациях – десятки и сотни тысяч клеток, ПИ даже при небольших – десятки и сотни клеток);
- инкубационный период (при ПО короткий, около нескольких часов, при ПИ продолжительный, от нескольких дней до недель).

Пищевые отравления могут быть двух типов: пищевые токсикозы или интоксикации (связаны с употреблением в пищу продуктов, в которых накопились экзотоксины, выделяемые микроорганизмами во внешнюю среду; они всасываются через ЖКТ в кровь и разносятся по всему организму, инкубационный период – несколько часов) и токсикоинфекции (связаны с накоплением большого количества живых патогенных микробов, которые могут размножаться и разрушаться уже в организме человека, при этом высвобождаются эндотоксины и оказывают токсическое действие, инкубационный период больше, до суток и более).

Пищевые отравления сопровождаются рвотой и диареей, могут появляться признаки поражения центральной нервной системы: головные боли, головокружение, быстрая утомляемость и др.; микотоксины обладают гепатотоксическим и канцерогенным действием. Инфекционные болезни могут быть специфичны только для человека, а могут быть общими для человека и животных – т.н. зооантропонозы. Источник инфекции – больные или бактерионосители, обычно это кишечные инфекции. Каждая инфекционная болезнь имеет типичные клинические проявления, однако общими признаками могут являться повышение

температуры, боли в животе, диарея, в т.ч. в тяжелой, геморрагической форме, признаки поражения печени, суставов, центральной нервной системы.

Большинство микроорганизмов пищевого происхождения вызывают локализованную инфекцию и повреждение тканей, но некоторые из них распространяются глубже, вызывая системную инфекцию. Для того, чтобы вызвать заболевание, микроорганизм должен быть способен преодолеть кислую среду желудка, прикрепиться к стенке кишечника и колонизировать ее, выдержав при этом конкуренцию с другой микрофлорой; противостоять защитным механизмам хозяина, вырабатывать токсины или проникать в клетки хозяина. Особую роль при этом играют реакции кворум-сенсинга (взаимодействия между бактериями) и формирование биопленок.

В результате появления и широкого использования молекулярно-генетических и иммунологических методов представления о патогенных микроорганизмах меняются. Анализ данных о строении геномов микробов свидетельствует об относительности их деления на патогенные, условно-патогенные и сапрофитные группы, а также классической классификации патогенных бактерий. Свойства любой группы микроорганизмов никогда не бывают стабильными и изменяются под влиянием разнообразных факторов внешней среды, в т.ч. антропогенных. Это сопровождается возникновением адаптивных мутаций, некоторые из которых могут быть связаны с появлением или усилением вирулентности (болезнетворности), и в какой-то степени объясняет феномен появления эмерджентных (внезапно возникающих) возбудителей заболеваний среди непатогенных групп микроорганизмов, усиление вирулентности и резистентности известных патогенов, большое число случаев алиментарных заболеваний смешанной и невыясненной этиологии. Следует отметить, что в литературе нет единства мнений о классификации патогенных бактерий, особенно это относится к группам возбудителей токсикоинфекций и инфекционных болезней.

По частоте возникновения и количеству случаев интоксикаций доминируют стафилококковые отравления, инфекционных болезней – сальмонеллезы, шигеллезы и кампилобактериозы. Большинство алиментарных инфекций и токсикоинфекций особенно тяжело протекает на фоне ослабленного иммунитета и сопутствующих заболеваний, они особенно опасны для детей раннего возраста.

В техническом регламенте Таможенного союза "О безопасности молока и молочной продукции" (ТР ТС 033/2013) в сыром молоке нормируются сальмонеллы, в молочных продуктах – сальмонеллы и листерии, золотистый стафилококк, плесени; в продуктах детского питания в показатели безопасности добавлены кишечная палочка и палочка цереус. К основным мерам обеспечения безопасности молочных продуктов на предприятиях отрасли, а, следовательно, предупреждения пищевых отравлений и инфекционных заболеваний, относятся следующие:

- 1 Использование доброкачественного молока от здоровых животных, соответствие других видов сырья и добавок требованиями стандартов.
- 2 Соблюдение технологических режимов тепловой обработки сырья, получения, хранения, транспортировки готовой продукции.
- 3 Систематическая борьба с грызунами и насекомыми – переносчиками заболеваний.
- 4 Строгое соблюдение правил санитарии и гигиены (особенно личной гигиены работниками предприятий, периодическое медицинское обследование на носительство инфекционных заболеваний и т.п.).
- 5 Систематический санитарно-микробиологический контроль сырья, готовой продукции, состояния производства.

Патогенные стафилококки были впервые выделены из гноя Пастером в 1880 г. Среди стафилококков встречаются сапрофитные, условно-патогенные (кожные) и патогенные штаммы, которые вырабатывают 18 серологических вариантов энтеротоксинов, относящихся к 4 типам – летальный, лизирующий эритроциты, разрушающий лейкоциты, вызывающий омертвление тканей и энтеротоксин, который может выдерживать более жесткие условия тепловой обработки, чем сами клетки, и вызывает пищевые токсикозы.

Стафилококки – грамположительные бактерии, имеющие правильную шаровидную форму

диаметром около 1 мкм, обычно располагающиеся в виде гроздевидных скоплений, факультативные анаэробы, не подвижны, спор не образуют; способны к росту в широком диапазоне температур (от 6,5°C до 45°C) при pH среды от 4,2 до 9,3, в присутствии высоких концентраций соли (до 15%) и 40% желчи.

Наиболее патогенные штаммы встречаются среди представителей коагулазоположительных видов *S. aureus* (золотистого стафилококка), *S. intermedius*, *S. hyicus*. *S. aureus* нормируется стандартами во многих молочных продуктах. Например, *S. aureus* не допускается в твороге в 0.1 г, сметане, ряженке, кефире 1 см³. Для диагностики используют среды с высоким содержанием соли (молочно-солевой агар) и с яичным желтком (желточно-солевой агар).

Для определения патогенных стафилококков проводится идентификация по ряду тестов, в т.ч. на коагуляцию плазмы крови (патогенные являются коагулазоположительными). Основным источником — молоко от коров, больных маститом (в сыром молоке проводят пробу на мастит), люди с гнойничковыми заболеваниями кожи и ангиной (к работе на пищевых предприятиях не допускаются).

ГОСТ 30347—2016 «Молоко и молочная продукция. Методы определения *Staphylococcus aureus*» предусматривает определение с предварительным обогащением и без предварительного обогащения. Первый метод основан на высеве навески продукта и (или) его разведения в жидкую селективную среду, инкубировании посевов, учете положительных пробирок (колб), пересеве культуральной жидкости на поверхность агаризованной селективно-диагностической среды, подтверждении по биохимическим признакам принадлежности выделенных типичных и (или) атипичных колоний к коагулазоположительным стафилококкам и *S. aureus*. Второй метод предусматривает высеивание продукта или его разведения на поверхность плотной селективной среды, инкубировании, подсчете типичных и (или) атипичных колоний, подтверждении по биохимическим признакам принадлежности выделенных колоний к коагулазоположительным стафилококкам и *S. aureus*.

Навеску продукта или его разведения засевают по 1 см³ в пробирки или колбочки с солевым бульоном в соотношении 1:10, которые выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1) °C в течение (24 — 48) ч. Предположительное присутствие коагулазоположительных стафилококков определяется по помутнению среды.

Для подтверждения принадлежности микроорганизмов к коагулазоположительным стафилококкам для получения изолированных колоний делают пересев петлей из бульона на чашки Петри с подсушенными средами типа Байрд-Паркер, желточно-солевого агара или молочно-солевого агара. Чашки с посевами выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1) °C в течение (24 — 48) ч. После термостатирования посева просматривают и отмечают рост характерных колоний.

На желточно-солевом агаре колонии коагулазоположительных стафилококков имеют форму плоских дисков диаметром (2 — 4) мм белого, желтого, кремового, лимонного, золотистого цвета с ровными краями; вокруг колоний образуется радужное кольцо и зона помутнения среды.

На молочно-солевом агаре колонии коагулазоположительных стафилококков растут в виде непрозрачных круглых колоний, окрашенных от белого до оранжевого цвета, диаметром (2 — 4) мм, слегка выпуклых.

На среде Байрд-Паркера колонии коагулазоположительных стафилококков растут в виде черных, блестящих, выпуклых колоний диаметром (1 — 1.5) мм, окруженных зоной просветления среды шириной (1 — 3) мм.

Для подтверждения принадлежности типичных и атипичных колоний к коагулазоположительным стафилококкам отбирают не менее пяти типичных и/или атипичных колоний с каждой чашки Петри и пересевают каждую отобранную колонию отдельно на поверхность скошенного питательного агара. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °C в течение (24 ± 3) ч.

Для подтверждения принадлежности к коагулазоположительным стафилококкам у выросших и отобранных микроорганизмов определяют отношение к окраске по Граму — по ГОСТ 32901; способность образовывать каталазу и способность коагулировать плазму крови

кролика.

Коагулазоположительные стафилококки окрашиваются по Граму положительно (в темно-фиолетовый цвет), имеют шарообразную форму и располагаются чаще (но не всегда) в виде скоплений, напоминающих гроздь винограда.

Для определения способности микроорганизмов образовывать каталазу на колонию микроорганизмов, взятую с поверхности питательной среды или извлеченную из нее, помещенную на предметное стекло и выдержанную на воздухе в течение 30 мин., пипеткой наносят каплю 3 %-ного раствора перекиси водорода. Если через (30 — 60) с на стекле появляются пузырьки газа, то считают, что они образовались в результате разложения перекиси водорода каталазой, образуемой микроорганизмами. Коагулазоположительные стафилококки образуют каталазу.

Способность коагулировать плазму крови кролика определяют у микроорганизмов, окрашивающихся положительно и образующих каталазу.

В пробирку с 0.5 см³ разведенной кроличьей плазмы вносят петлю суточной агаровой культуры и тщательно перемешивают. Одну пробирку с плазмой оставляют незасеянной, а в другую засевают контрольный штамм *S. aureus* (коагулазоположительный стафилококк). Пробирки помещают в термостат и выдерживают при температуре (37 ± 1) °С в течение (3 — 6) ч. Если по истечении 6 ч коагуляции плазмы не произошло, то пробирки оставляют в термостате до 24 ч. Если через 24 ч плазма не свернулась, то испытываемую культуру стафилококка относят к коагулазоотрицательной.

При определении коагулазной активности реакцию считают отрицательной, если в плазме не образуются отдельные нити или сгустки или если в плазме появились отдельные нити (реакцию плазмокоагуляции оценивают на один плюс). При определении коагулазной активности реакцию считают положительной, если: + + + + - сгусток плотный; + + + - сгусток, имеющий небольшой отсек; + + - сгусток в виде взвешенного мешочка.

Все три варианта являются положительным результатом. При получении положительной реакции считают, что в посевах обнаружен коагулазоположительный стафилококк.

Принадлежность выявленных коагулазоположительных стафилококков к *S. aureus* проводят по определению их способности образовывать ацетон и ферментировать мальтозу в аэробных условиях. Культуру высевают в пробирки со средой Кларка. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 48 ч. После инкубирования посевов к 1 см³ отобранной культуральной жидкости прибавляют 0.6 см³ раствора 1-нафтола и 0,2 см³ раствора гидроокиси калия. После добавления каждого реактива пробирку встряхивают. Появление розового окрашивания через (15 — 60) мин указывает на положительную реакцию. *S. aureus* образует ацетон.

Для определения способности ферментации мальтозы в аэробных условиях исследуемые культуры высевают уколом петлей в среду Гисса с мальтозой и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 48 ч. Изменение цвета среды указывает на положительную реакцию. *S. aureus* ферментирует мальтозу в аэробных условиях.

В соответствии с ГОСТ 32031-2012 МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ. ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* метод выявления бактерий *L. monocytogenes* в определенной массе или объеме продукта состоит из четырех последовательных этапов:

1 Первичное обогащение анализируемой пробы в жидкой среде со сниженной концентрацией селективных компонентов (полуконцентрированный бульон Фразера) при температуре 30 °С в течение 24 ч.

2 Вторичное обогащение посевного материала, полученного по п.1 в жидкой среде с полной концентрацией селективных компонентов (бульон Фразера) при температуре (37±1) °С в течение 48 ч.

3 Пересев посевного материала, полученного по 1 и 2, параллельно на две плотные селективные среды:

а) первая среда (обязательная): ALOA;

б) вторая среда: одна из плотных селективных сред, на выбор лаборатории, дополнительно к агару по 5.3 (а), такие как Оксфорд агар, Палкам агар или ПАЛ.

Посевы на ALOA культивируют при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ и просматривают через (24 ± 3) ч, а при необходимости еще через (24 ± 3) ч, контролируя наличие роста характерных для *L. monocytogenes* колоний.

Посевы на второй селективной среде культивируют при соответствующей температуре и просматривают на наличие роста колоний с характерным для бактерий рода *Listeria* ростом после определенного времени.

4 Идентификация отобранных колоний Пересев колоний, полученных по п. 3. с характерным ростом для бактерий рода *Listeria* и вида *Listeria monocytogenes* на плотные питательные среды и культивирование при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 3) ч и их идентификация по соответствующим морфологическим, культуральным и биохимическим признакам.

Практическое занятие 8

Методы определения санитарно-показательных микроорганизмов

Цель: изучить основные методы микробиологических исследований пищевых продуктов

Теоретическое обоснование

При периодическом контроле санитарно-гигиенического состояния предприятий по производству молочных продуктов и при вспышках инфекционных заболеваний используют прямые методы обнаружения патогенных микроорганизмов, которое проводится в лабораториях государственных органов надзора.

Обнаружение возбудителей заболеваний в пищевых продуктах осложняется контаминацией сопутствующей микрофлорой. На общем микробном фоне количество патогенов может быть незначительным, поэтому их прямое культивирование становится невозможным. Поэтому традиционные методы бактериологического анализа пищевых патогенов предполагает выполнение следующих основных этапов:

- ☐ Восстановление, накопление клеток в неселективной среде (посев 25 г продукта в 225 мл бульона при определении сальмонелл)
- ☐ Накопление в жидкой селективной среде с ингибиторами роста сопутствующей микрофлоры
- ☐ Пересев на дифференциально-диагностические агаровые среды для выявления специфических колоний
- ☐ Исследование культуральных, морфологических и тинкториальных свойств выделенной чистой культуры
- ☐ Подтверждение видовой принадлежности культуры с использованием молекулярно-генетических и иммунологических методов.

К широко применяемым молекулярно-генетическим методам относятся гибридизация ДНК, которая основана на взаимодействии комплементарных цепей со специфическими зондами, и полимеразно-цепная реакция (ПЦР), включающая следующие основные этапы:

- ☐ Подготовка (выбор целевых генов, подбор праймеров)
- ☐ Обогащение, экстракция, сепарирование образца;
- ☐ Амплификация (термоциклирование, изотермальное инкубирование)
- ☐ Анализ продуктов амплификации гель-электрофорезом, мечеными зондами, гибридизацией, секвенированием и т.д.

Среди иммунологических методов чаще всего используется серологическая диагностика и иммуноферментный анализ.

Серологическая диагностика – это изучение взаимодействия антител сыворотки крови и микробных антигенов. Например, для определения листерий применяются реакции непрямой агглютинации эритроцитарным антигенным диагностикумом и реакции связывания комплемента с инактивированным цитоплазматическим антигеном.

Иммуноферментный анализ (ИФА) – определение комплекса антиген-антитело за счет введения ферментативной метки с последующей ее детекцией с помощью субстрата, изменяющего окраску. Например, для определения энтерогеморрагической кишечной

палочки, листерий, золотистого стафилококка применяется твердофазная ИФА (сэндвич-метод, при котором антиген заключен между двумя слоями антител).

К современным методам диагностики патогенов относится фаготипирование (лизотипирование, фаготипаж) — метод дифференциации бактерий путем изучения свойств их умеренных фагов и по чувствительности к набору специфических бактериофагов.

5.2. Индикаторы патогенов (санитарно-показательные микроорганизмы)

Цель санитарно-микробиологического исследования молока и молочных продуктов: определить наличие или отсутствие опасных для человека микроорганизмов. Проводится по косвенным микробиологическим показателям, позволяющим судить о возможности обсеменения патогенными микробами.

Это связано с тем, что прямое обнаружение возбудителей инфекционных болезней имеет ряд трудностей. В больших количествах они высеваются во время эпидемий, очень трудно определяются в другое время (их меньше, чем непатогенных, и они подавляются другими). Для выращивания патогенных микроорганизмов нужны специальные среды и условия (это дорого, необходима гарантия полной безопасности, а, следовательно, полная стерильность). Поэтому санитарную оценку безопасности обычно проводят не прямым, а косвенным путем, с помощью индикаторов патогенов. При этом устанавливают факт загрязнения продукта микроорганизмами, содержащимися в кишечных (фекальных) выделениях. Чем обильнее это загрязнение, тем вероятнее попадание патогенных микроорганизмов. Это показатель санитарного неблагополучия, потенциальной опасности исследуемых объектов, поэтому они названы санитарно-показательными.

Согласно представлениям, сложившимся в санитарной микробиологии, индикаторы патогенов (санитарно-показательные микроорганизмы) должны отвечать следующим критериям:

1. Индикатор должен быть непатогенным, достаточно просто обнаруживаться и дифференцироваться, чтобы его можно было определять в производственных лабораториях.
2. Индикатор должен иметь кишечное происхождение и иметь тот же резервуар, что и патогенные бактерии.
3. Индикатор должен быть похож по скорости роста и условиям размножения в пищевых продуктах на кишечные патогены; сохранять жизнеспособность в окружающей среде в течение сроков, близких к срокам выживания патогенных микробов, выводимых из организма теми же путями.
4. Степень устойчивости к естественным или искусственным воздействиям должна быть не ниже, чем у соответствующих патогенных;
5. Постоянство свойств, т.е. они не должны изменяться под воздействием факторов внешней среды; отсутствие зависимости от наличия других микроорганизмов в питательной среде;
6. Равномерное распределение в исследуемых объектах.

Приведенному перечню требований не отвечает ни одна группа санитарно-показательных микроорганизмов, речь идет лишь о большем или меньшем соответствии критериям отбора.

В настоящее время в качестве СПМ чаще всего используют БГКП, *E. coli*, бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, к условным показателям санитарно-гигиенического благополучия производства можно отнести также КМАФАнМ, дрожжи и плесени, а в некоторых случаях также энтерококки, стафилококки, клостридии перфрингенс, кишечные бактериофаги, бактерии рода *протеус* и др.

Основные меры предупреждения развития СПМ связаны с неукоснительным соблюдением санитарии и гигиены на предприятиях отрасли, в т.ч. правил личной гигиены, мойки и дезинфекции оборудования, пола, стен, инвентаря, тары и т.д.

5.2. Бактерии группы кишечных палочек (БГКП) как основные санитарно-показательные микроорганизмы.

В группу БГКП входят представители нескольких родов семейства *Enterobacteriaceae*, в т.ч. *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*. Эти микроорганизмы обладают

многими общими морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами. Бактерии группы кишечных палочек — короткие (длина 1—3 мкм, ширина 0,5—0,8 мкм) полиморфные подвижные и неподвижные грамотрицательные палочки, не образующие спор. Бактерии этой группы хорошо растут на простых питательных средах: мясопептонном бульоне (МПБ), мясопептонном агаре (МПА). На МПБ дают обильный рост при значительном помутнении среды; осадок небольшой, сероватого цвета, легкоразбивающийся. Образуют пристеночное кольцо, плёнка на поверхности бульона обычно отсутствует. На МПА колонии прозрачные с серовато-голубым отливом, легко сливающиеся между собой. На среде Эндо образуют плоские красные колонии средней величины. Красные колонии могут быть с тёмным металлическим блеском (*E. coli*) или без блеска (*E. aerogenes*). Для лактозоотрицательных вариантов кишечной палочки (*B. paracoli*) характерны бесцветные колонии. Им свойственна широкая приспособительная изменчивость, в результате которой возникают разнообразные варианты, что усложняет их классификацию.

Большинство бактерий группы кишечных палочек (БГКП) не разжижают желатина, свертывают молоко, расщепляют пептоны с образованием аминов, аммиака, сероводорода, обладают высокой ферментативной активностью в отношении лактозы, глюкозы и других сахаров, а также спиртов. Не обладают оксидазной активностью. По способности расщеплять лактозу при температуре 37 °С БГКП делят на лактозоотрицательные и лактозоположительные кишечные палочки (ЛКП), или колиформные, которые формируются по международным стандартам. Из группы ЛКП выделяются фекальные кишечные палочки (ФКП), способные ферментировать лактозу при температуре 44,5 °С. К ним относится *E. coli*, не растущая на цитратной среде.

В соответствии с ГОСТ Р 53430-2009 «Молоко и продукты переработки молока. Методы микробиологического анализа» бактерии группы кишечных палочек (БГКП, коли-формы) — это микроорганизмы семейства энтеробактерий родов эшерихия, цитробактер, энтеробактер, клебсиела, серратия; бесспоровые, грамотрицательные, аэробные и факультативно-анаэробные палочки, сбраживающие лактозу с образованием кислоты и газа.

На этих свойствах основано определение БГКП в молочных продуктах в средах Кесслер (в соответствии с ГОСТ Р 53430-2009 по образованию газа) или Кода (по изменению цвета индикатора) после термостатирования при температуре (37±1) °С в течение 24 ч. Дифференциально-диагностическая — среда Эндо, на которой *E. coli* образует красные колонии с металлическим блеском.

Практическое занятие 9

Требования к микробиологическим показателям пищевых продуктов

Цель: изучить требования к микробиологическим показателям пищевых продуктов

Теоретическое обоснование

Требования к микробиологическим показателям изложены в нормативных документах, например, в Техническом регламенте таможенного союза (см. приложение)

Приложение N 8
к техническому регламенту
Таможенного союза
"О безопасности молока
и молочной продукции"
(ТР ТС 033/2013)

Допустимые уровни содержания микроорганизмов в продуктах переработки молока при выпуске их в обращение

Продукт	КМАФАнМ*(1), КОЕ*(2)/ см ³ (г), не более	Объем (масса) продукта, см ³ (г), в которой не допускаются				Дрожжи (Д), плесени (П), КОЕ/см ³ (г), не более	Примечание
		БГКП*(3) (колиформы)	патогенные, в том числе сальмонеллы	стафилококки S. aureus	листерии L.monocytogenes		
1	2	3	4	5	6	7	8
I. Питьевое молоко, питьевые сливки, молочный напиток, молочная сыворотка, пахта, продукты на их основе, термически обработанные							
1. Молоко питьевое, молочный напиток, в потребительской таре, в том числе обогащенные витаминами, макро- и микроэлементами, лактулозой, пребиотиками:							
а) пастеризованные	1 × 10 ⁵	0,01	25	1	25	-	требования промышленной стерильности: а) после термостатной выдержки при
б) стерилизованные	-	-	-	-	-	-	
в) ультрапастеризованные (УВТ) (с асептическим	-	-	-	-	-	-	
розливом)							температуре 37°С в течение 3 - 5 суток отсутствие видимых дефектов и признаков порчи (вздутие упаковки, изменение внешнего вида и другие), отсутствие изменений вкуса и консистенции б) после термостатной выдержки допускаются изменения: титруемой кислотности - не более чем на 2°Т КМАФАнМ - не более 10 КОЕ/см ³ (г)
г) ультрапастеризованные (без асептического розлива)	100	10	100	10	25	-	требования промышленной стерильности: а) после термостатной выдержки при температуре 37°С в
д) топлёные	2,5 × 10 ³	0,1	25	-	25	-	
2. Молоко питьевое, молочный напиток, во флягах и цистернах	2 × 10 ⁵	0,01	25	0,1	25	-	
3. Молочная сыворотка и пахта, в потребительской таре, пастеризованные	1 × 10 ⁵	0,01	25	1	25	-	требования промышленной стерильности: а) после термостатной выдержки при температуре 37°С в
4. Сливки и продукты на их основе, в том числе в потребительской таре, в том числе:							
а) пастеризованные	1 × 10 ⁵	0,01	25	1	25	-	
б) стерилизованные							

							течение 3-5 суток отсутствие видимых дефектов и признаков порчи (вздутие упаковки, изменение внешнего вида и другие), отсутствие изменений вкуса и консистенции б) после термостатной выдержки допускаются изменения: титруемой кислотности - не более чем на 2°Т КМАФАнМ - не более 10 КОЕ/см ³ (г)
в) обогащенные	1×10^5	0,01	25	1	25	-	
г) взбитые	1×10^5	0,1	25	0,1	25	-	
5. Сливки и продукты на их основе, в том числе во флягах, цистернах	2×10^5	0,01	25	0,1	25	-	
6. Напитки, коктейли, кисели, желе, соусы, кремы, пудинги, муссы, пасты, суфле, произведенные на основе молока, сливок, пахты, сыворотки, пастеризованные	1×10^5	0,1	25	1	25	-	
7. Продукты кисломолочные, продукты на их основе, со сроком годности не более 72 ч.: а) без компонентов	молочнокислых микроорганизмов - не менее 1×10^7	0,01	25	1	-	-	
б) с компонентами	молочнокислых микроорганизмов	0,01	25	1	-	-	
8. Продукты кисломолочные, продукты на их основе, со сроком годности более 72 ч.: а) без компонентов	- не менее 1×10^7 молочнокислых микроорганизмов	0,1	25	1	-	Д-50*(4) П-50	
б) с компонентами	- не менее 1×10^7 молочнокислых микроорганизмов	0,01	25	1	-	Д-50*(4) П-50	
в) обогащенные бифидобактериями и другими пробиотическими микроорганизмами	- не менее 1×10^7 бифидобактерий и (или) других пробиотических микроорганизмов	0,1	25	1	-	Д-50*(4) П-50	
9. Сметана, продукты на ее основе, в том числе с компонентами	- не менее 1×10^6 в сумме молочнокислых микроорганизмов - не менее 1×10^7	0,001 (для термичес ки обработа нных после сбражива ния сметанн х продукто в - 0,1 г/см ³)	25	1	-	для продуктов со сроком годности более 72 ч. - Д-50 П-50	
10. Термически обработанные сбраженные молочные и молочные составные продукты: а) без компонентов	-	1	25	1	25	Д-50	

б) с компонентами	-	1	25	1	25	П-50 Д-50 П-50
II. Творог, творожная масса, творожные продукты, продукты на их основе						
11. Творог без компонентов (кроме произведенного с использованием ультрафильтрации, сепарирования, зерненного# творога):						
а) со сроком годности не более 72 ч.	молочнокислых микроорганизмов - не менее 1×10^6	0,001	25	0,1	-	-
б) со сроком годности более 72 ч.	1×10^6	0,01	25	0,1	-	Д-100 П-50
в) замороженный	микрофлора, характерная для творожной закваски, отсутствие клеток посторонней микрофлоры	0,01	25	0,1	-	Д-100 П-50
12. Творог, произведенный с использованием ультрафильтрации, сепарирования:						
а) со сроком годности не более 72 ч.	микрофлора, характерная для творожной закваски, отсутствие клеток посторонней микрофлоры	0,01	25	0,1	-	-
б) со сроком годности более 72 ч.	микрофлора, характерная для творожной закваски, отсутствие клеток посторонней микрофлоры	0,01	25	0,1	-	Д-50 П-50
13. Творог зерненный	творожной закваски, отсутствие клеток посторонней микрофлоры, характерная для творожной закваски, отсутствие клеток посторонней микрофлоры	0,01	25	0,1	-	Д-100 П-50
14. Творог с компонентами, творожная масса, сырки творожные:						
а) со сроком годности не более 72 ч.	микрофлора, характерная для творожной закваски, отсутствие клеток посторонней микрофлоры	0,001	25	0,1	-	-
б) со сроком годности более 72 ч.	микрофлора, характерная для творожной закваски, отсутствие клеток посторонней микрофлоры	0,01	25	0,1	-	Д-100 П-50
в) замороженные	микрофлора, характерная для творожной закваски, отсутствие клеток посторонней микрофлоры	0,01	25	0,1	-	Д-100 П-50

15. Творожные продукты:	микрофлора, характерная для творожной закваски, отсутствие клеток посторонней микрофлоры						
а) со сроком годности не более 72 ч.	микрофлора, характерная для творожной закваски, отсутствие клеток посторонней микрофлоры	0,01	25	0,1	-	-	
б) со сроком годности более 72 ч.	микрофлора, характерная для творожной закваски, отсутствие клеток посторонней микрофлоры	0,01	25	0,1	-	Д-100 П-50	
в) замороженные	-	0,01	25	0,1	-	Д-100 П-50	
16. Термически обработанные творожные продукты, в том числе с компонентами	-	0,1	25	1	-	50 в сумме	
17. Альбумин молочный, продукты на его основе, кроме вырабатываемых путем сквашивания	2×10^5	0,1	25	0,1	-	Д-100 П-50	

III. Молоко, сливки, пахта, сыворотка, молочные продукты, молочные составные продукты на их основе, концентрированные и сгущенные стерилизованные, консервы молочные, молочные составные

18. Молоко сгущенное, концентрированное стерилизованное, сливки сгущенные стерилизованные,							требования промышленной стерильности: а) после термостатной
молочные продукты и молочные составные продукты сгущенные стерилизованные							выдержки при температуре 37°C в течение 6 суток отсутствие видимых дефектов и признаков порчи (вздутие упаковки, изменение внешнего вида и другие), отсутствие изменений вкуса и консистенции б) после термостатной выдержки: не допускаются изменения титруемой кислотности в микроскопическом препарате не должны обнаруживаться клетки микроорганизмов в) дополнительное требование к продуктам детского питания - отсутствие при посеве проб грибов, дрожжей, молочнокислых микроорганизмов
19. Молоко сгущенное и концентрированное в транспортной таре, в том числе во флягах и цистернах	2×10^5	0,01	25	0,1	25	-	
20. Молоко, сливки, сгущенные с сахаром, в потребительской таре:							
а) без компонентов	2×10^4	1	25	-	-	-	
б) с компонентами	2×10^4	1	25	-	-	-	
21. Молоко, сливки сгущенные с сахаром в транспортной таре	4×10^4	1	25	-	-	-	

22. Пахта, сыворотка сгущенные без сахара и с сахаром	5×10^4	1	25	-	-	-
23. Продукты молочные составные сгущенные с сахаром	$3,5 \times 10^4$	1	25	-	-	-

IV. Молочные продукты, молочные составные, сухие, сублимированные (молоко, сливки, кисломолочные продукты, напитки, смеси для мороженого, сыворотка, пахта, обезжиренное молоко)

24. Молоко коровье сухое а) для непосредственного употребления	5×10^4	0,1	25	1	-	-
б) для промышленной переработки	1×10^5	0,1	25	1	-	-
25. Напитки сухие молочные	1×10^5	0,01	25	1	-	П-50
26. Сливки сухие и сливки сухие с сахаром	7×10^4	0,1	25	1	-	-
27. Сыворотка молочная сухая	1×10^5	0,1	25	1	25	Д-50 П-100
28. Смеси сухие для мороженого	5×10^4	0,1	25	1	25 (для мягкого мороженого)	
29. Продукты кисломолочные сухие	1×10^5	0,1	25	1	-	Д-50 П-100
30. Пахта, заменитель цельного молока (сухие)	5×10^4	0,1	25	1	-	Д-50 П-100

V. Концентраты молочных белков, казеин, молочный сахар, казеинаты, гидролизаты молочных белков, сухие

31. Казеинаты пищевые	5×10^4 (сульфитредуцирующие клубодридии в 0,01 г не допускаются)	0,1	25	-	-	-
32. Концентрат сывороточный белковый	5×10^4	1	25	1	-	-
33. Концентрат казеина пищевого	$2,5 \times 10^3$	1	25	1	-	-

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические рекомендации

по организации самостоятельной работы обучающихся

по дисциплине «Пищевая микробиология»

для студентов направления подготовки

19.04.01 Биотехнология

Направленность (профиль) Биотехнология производства продукции из растительного сырья,
виноделия и бродильных производств

Введение

1. Цель и задачи освоения дисциплины

Цель освоения дисциплины «Пищевая микробиология» – сформировать у студентов научные основы и практические навыки обеспечения микробиологического контроля в пищевой промышленности.

Задачи освоения дисциплины образовательные: углубленное изучение вопросов систематики, морфологии, физиологии, биохимии, генетики, особенностей культивирования и определения микроорганизмов, применяющихся в пищевой промышленности и при получении биологически-активных веществ, а также вызывающих пороки продуктов, санитарно-показательных и патогенных микроорганизмов, вызывающих алиментарные заболевания; особенностей микробиологических процессов и организации микробиологического контроля производства различных групп продуктов функционального питания и биологически активных веществ;

развивающие: сформировать у обучающихся умение искать и анализировать конкретные виды биологических объектов в реальных процессах и превращениях; использовать для анализа знания биологических законов, закономерностей и их взаимосвязей;

воспитательные: на основе изучаемого материала сформировать у обучающихся навык владения методиками и методами, основанными на биологических законах и закономерностях как для изучения самих биологических объектов, так и для процессов с их участием.

Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине, соотнесённых с планируемыми результатами освоения образовательной программы

Код, формулировка компетенции	Код, формулировка индикатора	Планируемые результаты обучения по дисциплине (модулю), характеризующие этапы формирования компетенций, индикаторов
УК-1. Способен осуществлять критический анализ проблемных ситуаций на основе системного подхода, вырабатывать стратегию действий	ИУК-1.1 Входной и технологический контроль качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции для организации рационального ведения технологического процесса производства в целях разработки мероприятий по повышению эффективности производства;	Имеет представление о входном и технологическом контроле качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции для организации рационального ведения технологического процесса производства в целях разработки мероприятий по повышению эффективности производства
	ИУК-1.2 Анализировать свойства сырья и полуфабрикатов, влияющие на оптимизацию технологического процесса и качество готовой продукции, ресурсосбережение, эффективность и надежность процессов производства продуктов питания из растительного сырья на внедрение безотходных и малоотходных технологий переработки растительного сырья;	Способен анализировать свойства сырья и полуфабрикатов, влияющие на оптимизацию технологического процесса и качество готовой продукции, ресурсосбережение, эффективность и надежность процессов производства продуктов питания из растительного сырья на внедрение безотходных и малоотходных технологий переработки растительного сырья
	ИУК-1.3 Производить анализ	Производит анализ качества и

	качества и производства продуктов питания из растительного сырья на автоматизированных технологических линиях на соответствие требованиям технических регламентов по качеству, безопасности и прослеживаемости производства продуктов питания из растительного сырья;	производства продуктов питания из растительного сырья на автоматизированных технологических линиях на соответствие требованиям технических регламентов по качеству, безопасности и прослеживаемости производства продуктов питания из растительного сырья
	ИУК-1.4 Методы технохимического и лабораторного контроля качества сырья, полуфабрикатов и готовых изделий из растительного сырья	Владеет методами технохимического и лабораторного контроля качества сырья, полуфабрикатов и готовых изделий из растительного сырья
ОПК-1. Способен анализировать, обобщать и использовать фундаментальные и прикладные знания в области биотехнологии для решения существующих и новых задач в профессиональной области ПК-2. способностью к организации и проведению стандартных и сертификационных испытаний при производстве биотехнологической и пищевой продукции с целью организации эффективной системы контроля качества	ИОПК-1.1 Контроль технологических, микробиологических параметров режимов производства продуктов питания из растительного сырья на соответствие требованиям технологической и эксплуатационной документации;	Способен проводить контроль технологических, микробиологических параметров режимов производства продуктов питания из растительного сырья на соответствие требованиям технологической и эксплуатационной документации
	ИОПК-1.2 Разрабатывать методы технического контроля и испытания готовой продукции в процессе производства продуктов питания из растительного сырья на автоматизированных технологических линиях;	Способен разрабатывать методы технического контроля и испытания готовой продукции в процессе производства продуктов питания из растительного сырья на автоматизированных технологических линиях
	ИОПК-1.3 Физические, химические, биохимические, биотехнологические, микробиологические, теплофизические процессы, происходящих при производстве продуктов питания из растительного сырья;	Способен проводить физические, химические, биохимические, биотехнологические, микробиологические, теплофизические процессы, происходящих при производстве продуктов питания из растительного сырья
	ИПК-2.1 Контроль над соблюдением технологических режимов с использованием стандартных и сертификационных методик при производстве биотехнологической и пищевой	Способен осуществлять контроль над соблюдением технологических режимов с использованием стандартных и сертификационных методик при производстве

	продукции из растительного сырья;	биотехнологической и пищевой продукции из растительного сырья
	ИПК-2.2 Проводит исследования свойств сырья биотехнологических производств, культур микроорганизмов, пищевых и технологических добавок для выработки продукции из растительного сырья, виноделия и бродильных производств;	Способен проводить исследования свойств сырья биотехнологических производств, культур микроорганизмов, пищевых и технологических добавок для выработки продукции из растительного сырья, виноделия и бродильных производств
	ИПК-2.3 Проводит стандартные и сертификационные испытания производства продуктов питания из растительного сырья в целях учета сырья и продукции из растительного сырья, виноделия и бродильных производств для обеспечения нормативов выхода готовой продукции в соответствии с технологическими инструкциями;	Способен проводить стандартные и сертификационные испытания производства продуктов питания из растительного сырья в целях учета сырья и продукции из растительного сырья, виноделия и бродильных производств для обеспечения нормативов выхода готовой продукции в соответствии с технологическими инструкциями
	ИПК 2.4 Основы технологии производства продукции из растительного сырья, виноделия и бродильных производств	Имеет представление об основах технологии производства продукции из растительного сырья, виноделия и бродильных производств

4. Объем учебной дисциплины (модуля) и формы контроля *

Объем занятий: всего: 4 з.е. 144 акад.ч.	ОФО, в акад. часах
Контактная работа:	
Лекции	18
Лабораторных работ	36
Практических занятий	18
Самостоятельная работа	36
Формы контроля	
Экзамен	36

* Дисциплина (модуль) предусматривает применение электронного обучения, дистанционных образовательных технологий (если иное не установлено образовательным стандартом)

1. Общая характеристика самостоятельной работы студента при изучении дисциплины

Приступая к работе, каждый студент должен принимать во внимание следующие положения.

Дисциплина (модуль) построена по тематическому принципу, каждая тема представляет собой логически заверченный раздел.

Лекционный материал посвящен рассмотрению ключевых, базовых положений курсов и разъяснению учебных заданий, выносимых на самостоятельную работу студентов *(включается при наличии соответствующих занятий)*.

Практические занятия проводятся с целью закрепления усвоенной информации, приобретения навыков ее применения при решении практических задач в соответствующей предметной области *(включается при наличии соответствующих занятий)*.

Лабораторные работы направлены на приобретение опыта практической работы в соответствующей предметной области *(включается при наличии соответствующих занятий)*.

Самостоятельная работа студентов направлена на самостоятельное изучение дополнительного материала, подготовку к практическим и лабораторным занятиям, а также выполнения всех видов самостоятельной работы.

Для успешного освоения дисциплины, необходимо выполнить все виды самостоятельной работы, используя рекомендуемые источники информации.

1.1 Использование материала учебно-методического комплекса дисциплины

На первом этапе необходимо ознакомиться с рабочей программой дисциплины, в которой рассмотрено содержание тем дисциплины лекционного курса, взаимосвязь тем лекций с лабораторными занятиями, темы и виды самостоятельной работы. По каждому виду самостоятельной работы предусмотрены определённые формы отчетности.

Технологическая карта самостоятельной работы обучающегося

Коды реализуемых компетенций, индикатора(ов)	Вид деятельности студентов	Средства и технологии оценки	Объем часов, в том числе		
			СРС	Контактная работа с преподавателям	Всего
1 семестр					
УК-1 ИУК-1.1 ИУК 1.2 ИУК 1.3 ИУК-1.4 ОПК-1 ИОПК-1.1 ИОПК-1.2 ИОПК-1.3 ПК-2 ИПК-2.1 ИПК-2.2 ИПК-2.3 ИПК-2.4	Подготовка к лабораторной работе	Собеседование, выполнение индивидуальных заданий	22,8	1,2	24.00
УК-1 ИУК-1.1 ИУК 1.2 ИУК 1.3 ИУК-1.4 ОПК-1 ИОПК-1.1 ИОПК-1.2 ИОПК-1.3 ПК-2 ИПК-2.1 ИПК-2.2	Подготовка к практическим занятиям	Собеседование, выполнение индивидуальных заданий	11,4	0,6	12.00

ИПК-2.3 ИПК-2.4					
УК-1 ИУК-1.1 ИУК 1.2 ИУК 1.3 ИУК-1.4 ОПК-1 ИОПК-1.1 ИОПК-1.2 ИОПК-1.3 ПК-2 ИПК-2.1 ИПК-2.2 ИПК-2.3 ИПК-2.4	Подготовка к экзамену	Собеседование, выполнение индивидуальных заданий	34,2	1,8	36
Итого за 2 семестр					72.00

8.4 Методические материалы, определяющие процедуры оценивания знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности, характеризующих этапы формирования компетенций

Процедура проведения экзамена осуществляется в соответствии с Положением о проведении текущего контроля успеваемости и промежуточной аттестации обучающихся по образовательным программам высшего образования в СКФУ - программам бакалавриата, программам специалитета, программам магистратуры - в СКФУ, Положением о проведении текущего контроля успеваемости и промежуточной аттестации обучающихся по образовательным программам высшего образования - программам аспирантуры, программам ординатуры - в СКФУ.

Вопросы к экзамену

Вопросы к экзамену

Знать

Экзамен проводится в форме устного опроса

1. Микробиология пищевых продуктов как наука: история развития, роль в получении качественной продукции.
2. Классификация микроорганизмов в зависимости от их роли в формировании качества и безопасности пищевой продукции.
3. Систематика и общие свойства молочнокислых микроорганизмов. Понятие о гомо- и гетероферментативном брожении, предельной кислотности, энергии кислотообразования.
4. Характеристика молочнокислых кокков: лактококки, стрептококки, лейконостоки.
5. Характеристика молочнокислых палочек: термобактерии, стрептобактерии, бетабактерии.
6. Основные свойства уксуснокислых и пропионовокислых микроорганизмов, их применение в производстве пищевых продуктов.
7. Классификация, свойства, применение дрожжей и плесеней в производстве пищевых продуктов.
8. Определение пробиотиков. Классификация и свойства пробиотиков.
9. Пребиотики и синбиотики. Продукты функционального питания.
10. Систематика и общие свойства бифидобактерий, их влияние на организм.
11. Способы стимулирования развития бифидобактерий в пищевом сырье.
12. Характеристика и способы предупреждения развития микрофлоры, вызывающей пороки пищевых продуктов.
13. Характеристика и способы предупреждения развития бактериофагов в пищевых продуктах.

14. Понятие "санитарно-показательные микроорганизмы" и требования к ним.
15. Свойства, методы обнаружения и предупреждение развития санитарно-показательных микроорганизмов.
16. Значение показателя КМАФАнМ в организации микробиологического контроля пищевых продуктов и методы его определения.
17. Классификация и общая характеристика патогенных микроорганизмов, вызывающих алиментарные заболевания.
18. Свойства, методы обнаружения и предупреждение развития возбудителей пищевых отравлений.
19. Свойства, методы обнаружения и предупреждение развития возбудителей инфекционных болезней человека и зооантропонозов.
20. Факторы, учитываемые при подборе культур для заквасок.
21. Этапы выделения чистых культур молочнокислых микроорганизмов.
22. Селекция заквасочной микрофлоры.
23. Классификация заквасок.
24. Преимущества и перспективы использования заквасок прямого внесения.
25. Общие правила работы с заквасками на предприятии.
26. Этапы приготовления заквасок на предприятии.
27. Микробиологический контроль качества заквасок. Пороки заквасок.
28. Особенности микробиологических процессов при выработке пищевых продуктов разных видов.
29. Микробиология сырого и пастеризованного молока.
30. Классификация кисломолочных продуктов по виду заквасочной микрофлоры.
31. Этапы и методы микробиологического контроля пищевых продуктов.
32. Особенности микробиологических процессов при производстве масла и маслоподобных продуктов.
33. Особенности микробиологических процессов при производстве сыров.
34. Сыропригодность молока (сущность, методы определения)
35. Особенности заквасочной микрофлоры для разных групп сыров.
36. Этапы развития микрофлоры в процессе производства сыра.
37. Пороки сыров и методы их предупреждения.
38. Принципы консервирования пищевых продуктов.
39. Микробиологические аспекты технологии, пороки и меры их предупреждения стерилизованных пищевых консервов.
40. Микробиологические аспекты технологии, пороки и меры их предупреждения сгущенных пищевых консервов с сахаром.
41. Микробиологические аспекты технологии, пороки и меры их предупреждения сухих пищевых продуктов.
42. Нормирование микробиологических показателей и контроль производства пищевых консервов.
43. Проблемы микробиологической безопасности пищевых продуктов
44. Организация санитарного контроля на предприятиях пищевой промышленности
45. Системы управления качеством и безопасностью пищевых продуктов
46. Методы обнаружения и идентификации микроорганизмов
- Уметь, владеть**
47. Методы определения молочнокислых кокков
48. Методы определения молочнокислых палочек
49. Методы определения бифидобактерий
50. Способы стимулирования развития бифидобактерий в молоке.
51. Методы определения дрожжей
52. Методы определения плесеней
53. Методы исследования качества заквасок
54. Способы предупреждения развития микрофлоры, вызывающей пороки пищевых продуктов.

55. Способы предупреждения развития бактериофагов.
56. Методы обнаружения и предупреждение развития санитарно-показательных микроорганизмов
57. Методы обнаружения и предупреждение развития возбудителей пищевых отравлений.
58. Методы обнаружения и предупреждение развития возбудителей инфекционных болезней человека и зооантропонозов.
59. Микробиологический контроль сырого молока и сливок.
60. Методы снижения бактериальной обсемененности сырого молока.
61. Контроль эффективности пастеризации и стерилизации.
62. Микробиологический контроль производства питьевых молока и сливок.
63. Общие правила работы с заквасками на предприятии.
64. Этапы приготовления заквасок на предприятии.
65. Микробиологический контроль качества заквасок.
66. Этапы и методы микробиологического контроля кисломолочных продуктов.
67. Нормирование показателей и контроль производства масла.
68. Нормирование микробиологических показателей и контроль производства сыров.
69. Нормирование микробиологических показателей и контроль производства консервов.

Текущий контроль обучающихся проводится преподавателями, ведущими лабораторные занятия по дисциплине, в следующих формах:

- Подготовка к лабораторной работе
- Подготовка к практическому занятию
- Самостоятельное изучение литературы

Критерии оценивания результатов самостоятельной работы:

- конспект
 - Отчет по лабораторной работе
 - Отчет по практическому занятию
- приведены в Фонде оценочных средств по дисциплине

10.5 Методические материалы, определяющие процедуры оценивания знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности, характеризующих этапы формирования компетенций

Текущая аттестация студентов проводится преподавателем, ведущим лекционные и лабораторные занятия по дисциплине. К практическому занятию студент должен подготовить ответы на вопросы, выполнить задания по теме занятия. Максимальное количество баллов студент получает, если он активно участвует в работе, владеет материалом, умеет логично и четко излагать мысли, творчески подходит к решению основных вопросов темы, показывает самостоятельность мышления.

Содержание и объем материала, подлежащего проверке, определяется программой дисциплины. При проверке усвоения этого материала производится выявление полноты, прочности усвоения студентами теории и умения применять ее на практике в знакомых и незнакомых ситуациях.

Основанием для снижения оценки являются:

- слабое знание темы и основной терминологии;
- пассивность участия в групповой работе;
- отсутствие умения применить теоретические знания для решения практических задач;
- несвоевременность предоставления выполненных работ.

8. Учебно-методическое и информационное обеспечение дисциплины

8.1. Перечень основной и дополнительной литературы, необходимой для освоения дисциплины (модуля)

8.1.1. Перечень основной литературы:

1. Федорова, О. С. Пищевая микробиология : учебное пособие для студентов магистратуры по направлению подготовки 19.04.01 «Биотехнология» всех форм обучения / О. С. Федорова. — Красноярск : Сибирский государственный университет науки и технологий имени академика М.Ф. Решетнева, 2018. — 116 с. — Текст : электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART : [сайт]. — URL: <https://www.iprbookshop.ru/94897.html>
2. Прист Ф., Кемпбелл И. Микробиология пива . М.: Издательство «Профессия», 2005.- 368 с.
3. Аннемюллер Г., Мангер Г.-Й., Литц П. Дрожжи в пивоварении.- М.: Издательство «Профессия», 2016.- 428с.

8.1.2. Перечень дополнительной литературы:

1. Петухова, Е.В. Пищевая микробиология : учебное пособие / Е.В. Петухова, А.Ю. Крыницкая, З.А. Канарская ; Министерство образования и науки России, Казанский национальный исследовательский технологический университет. – Казань : Казанский научно-исследовательский технологический университет (КНИТУ), 2014. – 117 с. : табл., ил. – Режим доступа: по подписке. – URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=428098> (дата обращения: 20.04.2021). – Библиогр. в кн. – ISBN 978-5-7882-1594-5. – Текст : электронный.
2. Оганесянц Л.А., Панасюк А.Л., Федоренко Б. Общая технология вина.- М.: Издательство «Профессия», 2020.- 352 с.
3. Оганесянц Л.А., Панасюк А.Л. Специальная технология виноделия.- М.: Издательство «Профессия», 2022.- 238 с.
4. Артюхова, С.И. Биотехнология микроорганизмов: пробиотики, пребиотики, метабиотики : [16+] / С.И. Артюхова, О.В. Козлова ; Кемеровский государственный университет. – Кемерово : Кемеровский государственный университет, 2019. – 225 с. : ил. – Режим доступа: по подписке. – URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=600329> (дата обращения: 20.04.2021). – Библиогр.: с. 192 - 214. – ISBN 978-5-8353-2548-1. – Текст : электронный

Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет», необходимых для освоения дисциплины (модуля)

1

http://www.edu.ru/modules.php?op=modload&name=Web_Links&file=index&l_op=viewlink&cid=1697 – Федеральный портал «Российское образование», раздел «Пищевая промышленность»

2 <http://www.foodinfo.ru/> - информационный центр пищевой и перерабатывающей промышленности.

3 <http://www.news.d2d.ru/exhibitions/molinform> - межотраслевой информационно-консультационный центр Молинформ

9. Перечень информационных технологий, используемых при осуществлении образовательного процесса по дисциплине (модулю), включая перечень программного обеспечения и информационных справочных систем

При чтении лекций используется компьютерная техника, демонстрации презентационных мультимедийных материалов. На семинарских и практических занятиях студенты представляют презентации, подготовленные ими в часы самостоятельной работы.

Информационные справочные системы:

Информационно-справочные и информационно-правовые системы, используемые при изучении дисциплины:

1	ЭБС «Университетская библиотека онлайн». Договор № 128-04/16 от 23.05.2016 (базовая коллекция). Организация: ООО «Директ-Медиа». Срок действия договора: 23.05.2016 г. – 23.05.2019 г. Обновлено 13.05.2019 http://biblioclub.ru
2	Электронно-библиотечная система IPRbooks. Договор № 2039/16 от 27.04.2016 (базовая коллекция). Организация: ООО «Ай Пи Эр Медиа». Срок действия договора: 06.06.2016г. – 06.06.2019 г. Обновлено 13.05.2019 http://www.iprbookshop.ru

11. Особенности освоения дисциплины (модуля) лицами с ограниченными возможностями здоровья

Обучающимся с ограниченными возможностями здоровья предоставляются специальные учебники, учебные пособия и дидактические материалы, специальные технические средства обучения коллективного и индивидуального пользования, услуги ассистента (помощника), оказывающего обучающимся необходимую техническую помощь, а также услуги сурдопереводчиков и тифлосурдопереводчиков.

Освоение дисциплины (модуля) обучающимися с ограниченными возможностями здоровья может быть организовано совместно с другими обучающимися, а также в отдельных группах.

Освоение дисциплины (модуля) обучающимися с ограниченными возможностями здоровья осуществляется с учетом особенностей психофизического развития, индивидуальных возможностей и состояния здоровья.

В целях доступности получения высшего образования по образовательной программе лицами с ограниченными возможностями здоровья при освоении дисциплины (модуля) обеспечивается:

- 1) для лиц с ограниченными возможностями здоровья по зрению:
 - присутствие ассистента, оказывающий студенту необходимую техническую помощь с учетом индивидуальных особенностей (помогает занять рабочее место, передвигаться, прочесть и оформить задание, в том числе, записывая под диктовку),
 - письменные задания, а также инструкции о порядке их выполнения оформляются увеличенным шрифтом,
 - специальные учебники, учебные пособия и дидактические материалы (имеющие крупный шрифт или аудиофайлы),
 - индивидуальное равномерное освещение не менее 300 люкс,
 - при необходимости студенту для выполнения задания предоставляется увеличивающее устройство;
- 2) для лиц с ограниченными возможностями здоровья по слуху:
 - присутствие ассистента, оказывающий студенту необходимую техническую помощь с учетом индивидуальных особенностей (помогает занять рабочее место, передвигаться, прочесть и оформить задание, в том числе, записывая под диктовку),
 - обеспечивается наличие звукоусиливающей аппаратуры коллективного пользования, при необходимости обучающемуся предоставляется звукоусиливающая аппаратура индивидуального пользования;
 - обеспечивается надлежащими звуковыми средствами воспроизведения информации;
- 3) для лиц с ограниченными возможностями здоровья, имеющих нарушения опорно-двигательного аппарата (в том числе с тяжелыми нарушениями двигательных функций верхних конечностей или отсутствием верхних конечностей):
 - письменные задания выполняются на компьютере со специализированным программным обеспечением или надиктовываются ассистенту;
 - по желанию студента задания могут выполняться в устной форме.

12. Особенности реализации дисциплины с применением дистанционных образовательных технологий и электронного обучения

Согласно части 1 статьи 16 Федерального закона от 29 декабря 2012 г. № 273-ФЗ «Об образовании в Российской Федерации» под электронным обучением понимается организация образовательной деятельности с применением содержащейся в базах данных и используемой при реализации образовательных программ информации и обеспечивающих ее обработку информационных технологий, технических средств, а также информационно-телекоммуникационных сетей, обеспечивающих передачу по линиям связи указанной информации, взаимодействие обучающихся и педагогических работников. Под дистанционными образовательными технологиями понимаются образовательные технологии, реализуемые в основном с применением информационно-

телекоммуникационных сетей при опосредованном (на расстоянии) взаимодействии обучающихся и педагогических работников.

Реализация дисциплины может быть осуществлена с применением дистанционных образовательных технологий и электронного обучения полностью или частично. Компоненты УМК дисциплины (рабочая программа дисциплины, оценочные и методические материалы, формы аттестации), реализуемой с применением дистанционных образовательных технологий и электронного обучения, содержат указание на их использование.

При организации образовательной деятельности с применением дистанционных образовательных технологий и электронного обучения могут предусматриваться асинхронный и синхронный способы осуществления взаимодействия участников образовательных отношений посредством информационно-телекоммуникационной сети «Интернет».

При применении дистанционных образовательных технологий и электронного обучения в расписании по дисциплине указываются: способы осуществления взаимодействия участников образовательных отношений посредством информационно-телекоммуникационной сети «Интернет» (ВКС-видеоконференцсвязь, ЭТ – электронное тестирование); ссылки на электронную информационно-образовательную среду СКФУ, на образовательные платформы и ресурсы иных организаций, к которым предоставляется открытый доступ через информационно-телекоммуникационную сеть «Интернет»; для синхронного обучения - время проведения онлайн-занятий и преподаватели; для асинхронного обучения - авторы онлайн-курсов.

При организации промежуточной аттестации с применением дистанционных образовательных технологий и электронного обучения используются Методические рекомендации по применению технических средств, обеспечивающих объективность результатов при проведении промежуточной и государственной итоговой аттестации по образовательным программам высшего образования - программам бакалавриата, программам специалитета и программам магистратуры с применением дистанционных образовательных технологий (Письмо Минобрнауки России от 07.12.2020 г. № МН-19/1573-АН "О направлении методических рекомендаций").

Реализация дисциплины с применением электронного обучения и дистанционных образовательных технологий осуществляется с использованием электронной информационно-образовательной среды СКФУ, к которой обеспечен доступ обучающихся через информационно-телекоммуникационную сеть «Интернет», или с использованием ресурсов иных организаций, в том числе платформ, предоставляющих сервисы для проведения видеоконференций, онлайн-встреч и дистанционного обучения (Bigbluebutton, Microsoft Teams, а также с использованием возможностей социальных сетей для осуществления коммуникации обучающихся и преподавателей.

Учебно-методическое обеспечение дисциплины, реализуемой с применением электронного обучения и дистанционных образовательных технологий, включает представленные в электронном виде рабочую программу, учебно-методические пособия или курс лекций, методические указания к выполнению различных видов учебной деятельности обучающихся, предусмотренных дисциплиной, и прочие учебно-методические материалы, размещенные в информационно-образовательной среде СКФУ.