

Министерство сельского хозяйства РФ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Брянский государственный аграрный университет»

Институт ветеринарной медицины и биотехнологии

Кафедра эпизоотологии, микробиологии, паразитологии
и ветеринарно-санитарной экспертизы

Рябичева А.Е., Гулаков А.Н., Шепелев С.И.

МИКРОБИОЛОГИЯ МОЛОКА И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

учебно-методическое пособие
для проведения практических занятий
студентами направления подготовки
19.03.03 «Продукты питания животного происхождения»
профиль «Технология мяса и мясных продуктов»



Брянская область, 2022

УДК 579:637.1 (076)

ББК 28.4:36.95

Р 98

Рябичева, А. Е. Микробиология молока и молочных продуктов: учебно-методическое пособие для проведения практических занятий студентами направления подготовки 19.03.03 «Продукты питания животного происхождения» профиль «Технология мяса и мясных продуктов»/ А. Е. Рябичева, А. Н. Гулаков, С. И. Шепелев. – Брянск: Изд-во Брянский ГАУ, 2022. - 75 с.

Учебно-методическое пособие для проведения практических занятий подготовлено в соответствии с типовой учебной программой по курсу «Микробиология молока и молочных продуктов» студентами, обучающимися по направлению подготовки 19.03.03 «Продукты питания животного происхождения» профиль «Технология мяса и мясных продуктов».

Рецензент: кандидат сельскохозяйственных наук, доцент Лемеш Е.А.

Рекомендовано к изданию методической комиссии института ветеринарной медицины и биотехнологии Брянского ГАУ от 31.03.2022 г. протокол № 7.

© Брянский ГАУ, 2022

© Рябичева А.Е., 2022

© Гулаков А.Н., 2022

© Шепелев С.И., 2022

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ТЕМА 1. ОРГАНИЗАЦИЯ И СХЕМА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ НА ПРЕДПРИЯТИЯХ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПОСУДЫ, ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА.....	5
ТЕМА 2. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ПРОИЗВОДСТВЕ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ	11
ТЕМА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО КОЛИЧЕСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ В МОЛОКЕ.....	21
ТЕМА 4. МИКРОБИОЛОГИЯ ЗАКВАСОК.....	25
ТЕМА 5. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРОГО МОЛОКА.....	29
ТЕМА 6. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПИТЬЕВОГО МОЛОКА.....	35
ТЕМА 7. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ.....	38
ТЕМА 8. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЛИВОЧНОГО МАСЛА.....	41
ТЕМА 9. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ В СЫРОДЕЛИИ.....	43
ТЕМА 10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ, ЗАКВАСКАХ, БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТАХ.....	46
ТЕМА 11. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА БИФИДОБАКТЕРИЙ В КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ.....	48
ТЕМА 12. МИКРООРГАНИЗМЫ – ВОЗБУДИТЕЛИ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ.....	49
ТЕМА 13. ИССЛЕДОВАНИЯ МОЛОКА НА ПРИСУТСТВИЕ СТАФИЛОКОККОВ И МАСТИТНЫХ СТРЕПТОКОККОВ.....	61
ТЕМА 14. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ В МОЛОКЕ.....	63
ТЕМА 15. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ СГУЩЕННОГО, СУХОГО МОЛОКА И МОРОЖЕНОГО.....	64
ТЕМА 16. САНИТАРНО-ГИГИЕНИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ УСЛОВИЙ ПРОИЗВОДСТВА.....	66
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	74

ВВЕДЕНИЕ

Дисциплиной «Микробиология молока и молочных продуктов» предусматривается изучение биологических свойств микроорганизмов, их роли в процессах порчи и сущности микробиологических процессов, протекающих при выработке молочных продуктов. Освоение теоретических основ микробиологии молока и молочных продуктов ориентирует будущих специалистов на необходимость обеспечения высокого уровня санитарно-гигиенического состояния производства, предупреждение потерь и изготовление доброкачественной продукции.

В процессе изучения дисциплины студенты должны овладеть следующими знаниями и умениями.

знать:

- важнейшие микробиологические процессы, протекающие при выработке молочных продуктов;
- различные группы микроорганизмов, являющихся представителями технически полезной и технически вредной микрофлоры и процессы ими вызываемые;
- патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, встречающиеся в молоке и молочных продуктах и заболевания, ими вызываемые;
- основы микробиологического контроля технологического процесса и санитарно-гигиенического контроля условий производства при выработке различных видов молочной продукции;
- критерии безопасности и санитарные нормы качества продуктов из молочного сырья.

уметь:

- проводить микробиологическое исследование молочных продуктов;
- интерпретировать результаты проводимых исследований и оценивать качество молочных продуктов по микробиологическим показателям.

ТЕМА 1. ОРГАНИЗАЦИЯ И СХЕМА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ НА ПРЕДПРИЯТИЯХ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПОСУДЫ, ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Задание: Ознакомиться с задачами и целями осуществления микробиологического контроля, микробиологическими критериями безопасности молочных продуктов, схемой микробиологического контроля на предприятиях молочной промышленности. Приобретение навыков приготовления питательных сред, посуды для проведения микробиологического анализа.

Задачей микробиологического контроля на предприятиях молочной промышленности является определение различных микробиологических показателей.

Группы микробиологических критериев безопасности пищевых продуктов:

1. Группа показателей санитарного состояния

Непосредственное выявление патогенных микроорганизмов (возбудителей пищевых инфекций) в пищевых продуктах невозможно из-за низкого их содержания в продукте по сравнению с содержанием сапрофитной микрофлоры. Поэтому при санитарной оценке пищевых продуктов используют косвенные методы, позволяющие определить уровень загрязнения человека выделениями человека. Чем выше этот уровень, тем вероятнее попадание в объект патогенных микроорганизмов – возбудителей кишечных инфекций.

Санитарная оценка пищевых продуктов проводится по двум микробиологическим показателям: общей бактериальной обсемененности (КМАФАнМ) и наличию бактерий группы кишечной палочки (БГКП).

Общая бактериальная обсемененность (КМАФАнМ) - количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в 1 г или 1 см³ продукта.

Высокая бактериальная обсемененность пищевых продуктов свидетельствует о недостаточной термической обработке сырья, недостаточно тщательной мойке и дезинфекции оборудования, неудовлетворительных условиях хранения и транспортировки продукции.

Общую бактериальную обсемененность определяют в молочных продуктах, в которых отсутствует технически полезная микрофлора (микрофлора заквасок). Для определения этого показателя используют универсальные питательные среды: мясопептонный агар (МПА) или среду для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

Наличие бактерий группы кишечной палочки (БГКП) наблюдается во всех молочных продуктах (за исключением стерилизованных). БГКП объединяют представителей нормальной микрофлоры кишечника человека и относятся к семейству Enterobacteriaceae родов Escherichia, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Serratia. БГКП выполняют функцию индикатора фекального загрязнения и относятся к санитарно-показательным микроорганизмам.

Выбор БГКП в качестве санитарно-показательных микроорганизмов для оценки санитарного состояния пищевых продуктов не случаен. Санитарно-показательные микроорганизмы должны отвечать следующим требованиям:

- Эти микроорганизмы должны являться представителями нормальной микрофлоры организма, в нем развиваться и размножаться;
- Они должны в больших количествах выделяться из организма;
- В окружающей среде они должны длительное время сохранять свою жизнеспособность, но не размножаться;
- Определение этих микроорганизмов должно осуществляться простыми методами.

В нормативных документах (государственных, отраслевых стандартах (ГОСТ, ОСТ), технических условиях, требованиях СанПиНа) обычно указывается количество продукта, в котором БГКП не допускаются. При высоком уровне загрязнения продукта БГКП возрастает вероятность нахождения в нем патогенных микроорганизмов – возбудителей кишечных инфекций (дизентерии, брюшного тифа, холеры и др.). Для определения БГКП применяют накопительную среду Кесслера, а идентификацию этих бактерий проводят с использованием дифференциально-диагностической среды Эндо.

2. Группа условно-показательных микроорганизмов.

К этой группе относятся микроорганизмы – возбудители пищевых отравлений, таких как *Proteus vulgaris*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*.

В молочных продуктах, богатых белком (например, твороге, сыре) нормируется содержание коагулазоположительного золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*) – возбудителя пищевой интоксикации. При определении золотистого стафилококка используют элективные питательные среды: молочно-солевой (МСА) или желточно-солевой (ЖСА) агар.

3. Группа патогенных микроорганизмов

Из патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах определяют сальмонеллы. Проводят исследования на наличие сальмонелл органы Санэпиднадзора. Обычно, сальмонеллы не допускаются в 25 г (см³) продукта.

Для определения сальмонелл используют накопительные питательные среды (селенитовую, Кауфмана, Мюллера) и дифференциально-диагностические среды (Плоскирева, Левина).

4. Группа показателей микробиологической стабильности продукта.

К этой группе относятся микроскопические грибы и дрожжи, которые, как известно, являются возбудителями порчи продукта. Этот показатель нормируется в молочных продуктах с растительными добавками. Динамику роста грибов и дрожжей определяют при установлении сроков годности и режимов хранения новых видов продуктов.

Кроме вышперечисленных микробиологических показателей для прогнозирования качества выпускаемой молочной продукции целесообразно определять отдельные группы микроорганизмов, которые относятся к представителям

технически вредной микрофлоры (липолитические, протеолитические бактерии) и полезной микрофлоры (молочнокислые и др. бактерии).

Организация микробиологического контроля

Микробиологический контроль осуществляется в лаборатории предприятия. При отсутствии микробиологической лаборатории на предприятии указанный контроль может осуществляться по договору с органами госсанэпиднадзора или лабораториями, аккредитованными для проведения микробиологических исследований.

Для проведения микробиологических исследований в лаборатории должен быть оборудован бокс, состоящий из двух помещений – собственно бокса и предбоксника. В боксе должны быть установлены бактерицидные лампы, количество которых определяют из расчета $2,5 \text{ Вт/м}^2$. Кроме того в лаборатории должно иметься следующее оборудование: термостаты (для культивирования микроорганизмов при определенной температуре), автоклав (для стерилизации питательных сред, посуды, инструментов), сушильный шкаф или печь Пастера (для стерилизации посуды), микроскопы (для определения качественного состава микрофлоры). Лаборатории молочных заводов должны быть аккредитованы государственной санитарно-эпидемиологической службой на право проведения исследований, характеризующих гигиенические показатели безопасности выпускаемой продукции.

При организации микробиологического контроля руководствуются «Инструкцией по микробиологическому контролю производства на предприятиях молочной промышленности, утвержденной 28.12.87 Госагропромом СССР, а также санитарными правилами и нормами СанПиН 2.3.4. 551-96, государственными, отраслевыми стандартами и техническими условиями на различные группы молочных продуктов.

Микробиологическому контролю подлежат:

- Сырье (например, сырое молоко), полуфабрикаты (например, закваски), готовая продукция. Такой контроль еще называют контролем технологического процесса. Он позволяет установить эффективность процесса пастеризации молока, выявить места инфицирования на различных этапах технологического процесса производства молочных продуктов.

- Оборудование, трубопроводы, вспомогательные материалы, вода, воздух производственных помещений, тара, упаковочные материалы и др. Микробиологический контроль этих объектов позволяет судить о санитарно-гигиеническом состоянии производства и соблюдении санитарных норм и правил личной гигиены работников производства.

Так, готовая продукция (молоко, сливки, кисломолочные напитки) должны контролироваться микробиологической лабораторией предприятия не реже 1 раза в 5 дней, сметана и творог – не реже 1 раза в 3 дня, качество санитарной обработки оборудования должно оцениваться по каждой единице оборудования не реже 1 раза в 10 дней. Чистоту рук работников следует контролировать не реже 3 раз в месяц.

Характеристика питательных сред, используемых для микробиологического исследования молочных продуктов

Для микробиологического исследования молочных продуктов и проведения санитарно-бактериологического контроля условий производства используют *натуральные* (приготовленные из продуктов животного и растительного происхождения) *плотные и жидкие питательные среды*.

Плотные питательные среды готовятся из жидких путем внесения гелеобразующих веществ (агар-агара или желатина).

Агар-агар – полисахарид, не используемый микроорганизмами для питания. Получают его из морских водорослей. Плавится агар при температуре около 100⁰С и затвердевает при температуре около 40⁰С. Плотные питательные среды используют для количественного учета микроорганизмов (каждая клетка вырастает на плотной среде в виде изолированной колонии). Путем посева молочных продуктов и их разведений на плотные питательные среды определяют КМАФАнМ, содержание золотистого стафилококка, микроскопических грибов и дрожжей, количество молочнокислых, гнилостных бактерий, спор бактерий рода *Bacillus* и др. Содержание агар-агара в плотных питательных средах составляет около 2%.

Желатин – белок, который выделяют из костей и хрящей животных при их вываривании. Многие микроорганизмы, обладающие протеолитической активностью, могут гидролизовать желатин, а продукты гидролиза использовать в качестве источника питания. Способность разжижать среды с желатином является диагностическим признаком при идентификации микроорганизмов.

Питательные среды бывают универсальные (для культивирования микроорганизмов различных групп), накопительные, элективные (для накопления и выявления микроорганизмов определенных групп) и дифференциально-диагностические (для определения видовой принадлежности микроорганизмов).

В качестве универсальных питательных сред используют жидкие (например, мясопептонный бульон – МПБ) и плотные (например, мясопептонный агав (МПА) и среда Сабур).

Накопительные среды имеют жидкую консистенцию и используются для выявления микроорганизмов, содержание которых в продукте незначительное. Накопительные питательные среды используются для выявления наличия бактерий группы кишечной палочки – БГКП (среда Кесслера) и сальмонелл (среда Кауфмана, селенитовая среда). При наличии роста бактерий на накопительных питательных средах в дальнейшем, как правило, делается пересев на плотные дифференциально-диагностические питательные среды, которые используются для идентификации выросших на накопительных средах бактерий. Так, в качестве дифференциально-диагностической среды для идентификации БГКП используется среда Эндо.

Элективные (избирательные) питательные среды имеют плотную консистенцию. Примером элективной питательной среды может являться молочно-солевой агар, который используется для выявления в молочных продуктах золотистого стафилококка.

В заводских лабораториях для приготовления питательных сред обычно используют промышленно изготавливаемые сухие среды, которые представляют собой гигроскопические порошки, легко растворяющиеся в воде. Некоторые питательные среды готовят по прописям из отдельных компонентов (молока, пептона, дрожжевого экстракта, питательных солей и т.д.).

После приготовления питательных сред их разливают в пробирки или колбы, закрывают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют в автоклаве. Наиболее часто автоклавирование ведется при избыточном давлении 0,1 Мпа и, следовательно, температуре 121°C в течение 15-30 мин. Некоторые питательные среды стерилизуют при более низком избыточном давлении или текучим паром (не создавая избыточного давления).

Приготовление посуды для микробиологического анализа

Для проведения микробиологического анализа используют чашки Петри, которые герметично упаковываются в пергаментную бумагу и стерилизуются. Пипетки на 1 см³ закрывают ватными тампонами и также заворачивают в бумагу.

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

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

Приготовление питательных сред из промышленно выпускаемых сухих сред

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

Приготовление питательных сред из отдельных компонентов

Среды для культивирования молочнокислых бактерий

Обезжиренное молоко. Молоко отделяют от сливок, разливают в пробирки или колбы, закрывают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют в автоклаве при избыточном давлении 0,05 Мпа. Среду используют для изучения физиологических свойств и для группового количественного учета молочнокислых бактерий.

Эту среду используют также для получения лабораторной закваски из сухих и жидких заквасок и бактериальных концентратов.

Агар с гидролизованным молоком. Вначале готовят гидролизованное молоко путем гидролиза стерильного обезжиренного молока с помощью фермента панкреатина при 45°C в течение 3-х суток в присутствии хлороформа. Полу-

ченный гидролизат разводят водопроводной водой (в соотношении 1:2). Затем вносят 1,5-2% агара и 2-3% мела в виде тонкого порошка. Среду стерилизуют. Агар с гидролизированным молоком используют для количественного учета молочнокислых бактерий в молочных продуктах.

Среда для количественного учета гнилостных бактерий

Молочный агар готовят путем внесения 20% горячего стерильного обезжиренного молока в стерильный расплавленный 2% водный раствор агара-агара. Используется эта среда для количественного учета протеолитических и пептонизирующих бактерий (микрোকков, маммококков).

Среды для выявления коагулазоположительных стафилококков

Основа – солевой агар: к мясопептонному бульону с рН 7,2-7,4 добавляют 2%-ного агара и 6,5%-ного хлористого натрия, расплавляют на водяной бане, при необходимости фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают мерным цилиндром по 100 см³ в колбы вместимостью 250 см³ и стерилизуют при 121⁰С в течение 30 минут. Получают солевой агар. Вместо МПБ можно использовать сухой питательный агар, добавив к нему 6,5% хлористого натрия.

Желточно-солевой агар. К расплавленному и охлажденному до 45⁰С солевому агару (основе) добавляют 20 см³ эмульсии яичного желтка. После полного размешивания желточно-солевой агар разливают в стерильные чашки Петри по 20 см³ и хранят в холодильнике 5-7 дней.

Для приготовления эмульсии яичного желтка на дно стерильной чашки Петри помещают куриное яйцо, которое тщательно протирают ватой, смоченной этиловым спиртом. Стерильным пинцетом пробивают с двух противоположных сторон два отверстия. Через одно из этих отверстий из яйца полностью удаляют белок, а затем, несколько увеличив отверстие, выливают желток в стерильную колбу вместимостью 200 см³. Желток добавляют в колбу с 4-мя объемами стерильного физиологического раствора, затем содержимое тщательно встряхивают до получения гомогенной массы.

Молочно-солевой агар. К 100 см³ расплавленного и охлажденного до 45⁰С солевого агара вносят 10 см³ обезжиренного стерильного молока, тщательно размешивают и разливают тонким слоем в стерильные чашки Петри.

Контрольные вопросы

1. Перечислить группы микробиологических критериев безопасности молочных продуктов.
2. Какие микробиологические показатели определяют для оценки качества молочных продуктов?
3. Что такое КМАФАнМ и в каких видах молочных продуктов определяется этот показатель?
4. Почему бактерии группы кишечной палочки выбраны в качестве санитарно-показательных для молочных продуктов?
5. Какие микроорганизмы из группы условно-патогенных микроорганизмов определяют в сыре, твороге?

6. Какие патогенные микроорганизмы определяют в молоке и молочных продуктах?
7. Какие микробиологические показатели определяют для оценки микробиологической стабильности продукта?
8. Кто осуществляет микробиологический контроль на предприятиях молочной промышленности?
9. Каким оборудованием и какой посудой должна быть оснащена микробиологическая лаборатория?
10. Перечислить объекты микробиологического контроля на предприятиях молочной промышленности.
11. С какой периодичностью осуществляется микробиологический контроль готовой продукции на предприятиях молочной промышленности?
12. Каким образом готовят посуду для проведения микробиологического анализа?
13. Для чего используются накопительные питательные среды?
14. Какие питательные среды используются для определения молочнокислых бактерий в молоке и молочных продуктах?
15. Как готовятся и для чего используются плотные питательные среды?
16. Назовите питательные среды, которые используются для определения микробиологических показателей в молоке и молочных продуктах.
17. Какие питательные среды используются для выявления и идентификации бактерий группы кишечной палочки.
18. Какие питательные среды являются элективными для коагулазоположительных стафилококков? Как они готовятся?

ТЕМА 2. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ПРОИЗВОДСТВЕ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Задание: Приготовить фиксированные окрашенные препараты чистых культур молочнокислых бактерий. Рассмотреть препараты под микроскопом, используя иммерсионный объектив. Зарисовать микроскопическую картину разных видов молочнокислых бактерий и привести их описание.

Приготовить фиксированные окрашенные препараты культурных и «диких» дрожжей. Рассмотреть препараты под микроскопом с объективом 90х и зарисовать микроскопическую картину.

Молочнокислые бактерии

Молочнокислые бактерии объединены в одну группу по их способности сбраживать углеводы с образованием преимущественно молочной кислоты. Наряду с основным метаболитом, эти бактерии накапливают и другие продукты: уксусную кислоту, этанол, диоксид углерода, ароматические вещества (ацетальдегид, диацетил) и т. д.

Молочнокислые бактерии в основном неподвижны, по Грамму красятся положительно, спор не образуют. В молодых культурах некоторые штаммы образуют слизистую капсулу.

По отношению к кислороду молочнокислые бактерии являются факультативными анаэробами. Молочнокислые бактерии – единственная группа микроорганизмов, лишенных каталазы, но способных расти в присутствии кислорода воздуха. Функцию каталазы выполняет фермент пероксидаза. У молочнокислых бактерий отсутствуют гемсодержащие ферменты, поэтому энергию они получают только в процессе молочнокислого брожения, которое условно разделяют на гомоферментативное и гетероферментативное. При гомоферментативном брожении основным метаболитом является молочная кислота; при гетероферментативном брожении кроме молочной кислоты образуются также диоксид углерода, этанол и (или) уксусная кислота.

Температурный диапазон жизнедеятельности лактобактерий довольно широк: мезофильные виды растут при оптимальной температуре 25–32 °С; минимальной температурой для них является 10 °С. Для термофильных видов оптимальная температура роста колеблется в пределах 38–45 °С, а минимальная – 20–22 °С. Имеются сведения, что некоторые молочнокислые бактерии способны расти при температуре 3–5 °С.

Клетки молочнокислых бактерий имеют шаровидную или палочковидную форму.

А. Шаровидные молочнокислые бактерии относятся к семейству *Streptococcaceae*, объединяющему роды *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* и *Leuconostoc*.

Lactococcus lactis subspecies lactis (молочнокислый стрептококк, сокращенно *Lac. lactis*). Клетки сферические или овальные размером (0,5–1,2) (0,5–1,5) мкм, соединенные попарно (диплококки) или в виде коротких цепочек (рис. 1, а). Оптимальная температура развития составляет 28–32 °С.

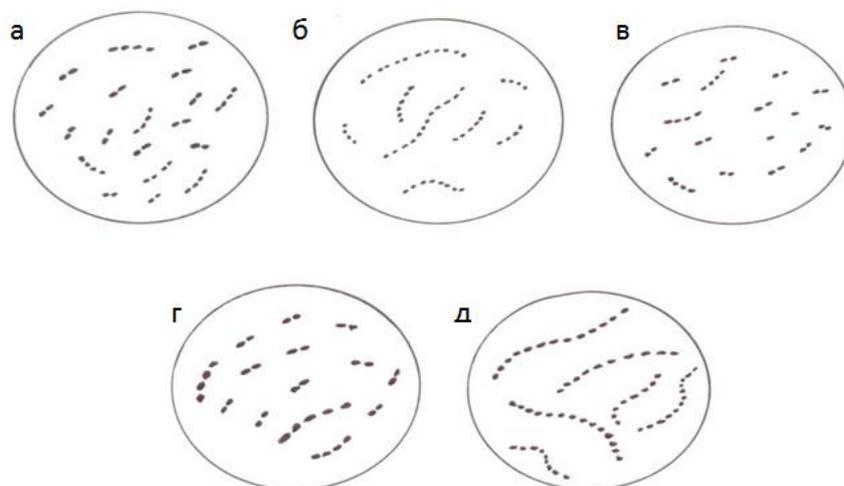


Рис. 1. Молочнокислые стрептококки и лейконостоки: а – *Lac. lactis*; б – *Lac. cremoris*; в – *Lac. diacetylactis*; г – *S. thermophilus*; д – *Leuc. Cremoris*.

Активные штаммы этого вида свертывают молоко за 4–6 ч, образуя ровный плотный сгусток. Предельная кислотность (через 5–7 суток развития в молоке) достигает 125 °Т. *Lac. lactis ssp. lactis* восстанавливает и свертывает лакмусовое молоко, разлагает аргинин с образованием аммиака, не растет в средах с 6,5 % NaCl и в щелочной среде с pH 9,5. Штаммы этого вида входят в состав заквасок для кисломолочных напитков, творога, сметаны, кисломолочного масла, сыров с низкой температурой второго нагревания.

Отдельные штаммы *Lac. lactis* синтезируют бактериоцин низин, обладающий антагонистической активностью по отношению к большинству грамположительных бактерий (стафилококков, микрококков, бацилл, клостридий, лактобактерий и др.). Низин используется в консервной промышленности для подавления развития спорообразующих бактерий.

Lactococcus lactis ssp. cremoris (сливочный стрептококк – *Lac. cremoris*). Клетки шаровидные, располагаются в виде коротких и длинных цепочек (рис. 1, б). Оптимальная температура роста 25–30 °С. Молоко свертывает за 6–8 ч, образуя плотный сгусток слегка вязкой или сметанообразной консистенции, что обусловлено способностью сливочного стрептококка синтезировать полисахариды. Предельная кислотность в молоке не превышает 110–115 °Т.

Штаммы этого вида не образуют аммиак из аргинина, не растут в средах с 4 % NaCl и pH 9,5. Сливочный стрептококк используется в заквасках для сметаны, кисломолочного масла и других кисломолочных продуктов.

Некоторые штаммы этого подвида синтезируют бактериоцин лактококцин.

Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis (ароматобразующий стрептококк – *Lac. diacetylactis*). Клетки расположены чаще всего в виде диплококков и коротких цепочек (рис. 1, в). Оптимальная температура роста 25–30 °С. Имеет довольно слабую кислотообразующую активность – молоко свертывает за 16–18 ч, предельная кислотность не превышает 70–100 °Т. Сгусток молока плотный, часто с наличием пузырьков газа (CO₂), имеет приятный специфический запах, обусловленный накоплением диацетила. Штаммы этого вида расщепляют лактозу и цитраты с образованием диоксида углерода, диацетила и ацетоина. В утилизации цитратов участвуют два фермента – цитратпермеаза, транспортирующая цитрат в клетку через цитоплазматическую мембрану, и цитратлиаза, расщепляющая цитрат на ацетат и оксалоацетат.

Ароматобразующий стрептококк широко используется в заквасках для большинства ферментированных молочных продуктов.

Streptococcus salivarius ssp. thermophilus (термофильный стрептококк – *S. thermophilus*). Клетки имеют овальную или шаровидную форму, диаметр 0,7–1,0 мкм, часто соединены в длинные цепочки (рис. 1, г). Активные штаммы свертывают молоко за 3,5–4 ч при оптимальной температуре 40–42 °С. Температурный диапазон роста составляет 20–50 °С. Предельная кислотность в молоке не превышает 100–115 °Т. Термофильный стрептококк чувствителен к содержанию в среде NaCl и антибиотиков: он не растет в среде с содержанием 4 % NaCl и 0,01 МЕ/см³ пенициллина.

Термофильный стрептококк вводят в состав заквасок для производства ряженки, варенца, йогурта, сыров с высокой температурой второго нагревания.

Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris (*Leuc. cremoris*). Клетки шаровидные или линзовидные размером (0,5–0,7) (0,7–1,2) мкм, соединены попарно или в короткие цепочки (см. рис. 1, д). Оптимальная температура роста составляет 22–25 °С, минимальная – около 5 °С. Молоко не свертывает, так как обладает низкой протеиназной активностью. Лейконостоки способны расти в молоке при добавлении в него ростовых факторов (дрожжевого или кукурузного экстракта). Предельная кислотность не превышает 40–50 °Т. После снижения рН среды до 5,0–4,5 образует диацетил, поэтому данный вид используют в многовидовых заквасках для производства сыров и кисло-сливочного масла в сочетании с *Lac. lactis* и *Lac. cremoris*.

Leuconostoc mesenteroides ssp. dextranicum (*Leuc. dextranicum*). Данный вид морфологически схож с *Leuc. cremoris*. Свертывает молоко при оптимальной температуре 22–25 °С в течение трех – четырех суток. Предельная кислотность составляет 70–80 °Т.

Размножение лейконостоков стимулирует добавление в среду марганца, что приводит также к повышенному синтезу метаболитов: диацетила, уксусной кислоты, диоксида углерода.

Лейконостоки входят в состав естественной микрофлоры кефирного грибка и играют большую роль в формировании его вкуса и запаха.

Многие штаммы *Leuc. dextranicum* синтезируют из сахарозы полисахарид декстран, образующий слизь.

Pediococcus cerevisiae. Кокки располагаются тетрадами, парами, редко встречаются одиночные клетки. Оптимальная температура роста составляет 22–25 °С, при температуре 35 °С рост прекращается. Тип брожения – гомоферментативный, приводит к образованию *DL*-молочной кислоты (обычно преобладает *L*(+)-изомер). Факультативные анаэробы или микроаэрофилы.

Часто встречаются в испорченном пиве, в молочных продуктах обнаруживаются редко. Педиококки включают в состав заквасок для производства сырокопченых колбас.

Б. Палочковидные молочнокислые бактерии относят к семейству *Lactobacillaceae*, роду *Lactobacillus*, который включает три подрода: *Thermobacterium* (термобактерии), *Streptobacterium* (стрептобактерии) и *Betabacterium* (бетабактерии) (по Орла-Йенсену).

По типу брожения лактобациллы распределены на три группы:

I – облигатно-гомоферментативные (термобактерии) – 15 видов;

II – факультативно-гетероферментативные (стрептобактерии) – 11 видов;

III – облигатно-гетероферментативные (бетабактерии) – 18 видов.

В молочной промышленности используют следующие виды лактобацилл.

Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus (болгарская палочка, или *L. bulgaricus*). Форма клеток в молоке – длинные и короткие палочки размером (5–20) (0,8–1,0) мкм (рис. 2, а). При окрашивании препаратов из молока метиленовым синим в клетках часто наблюдаются зерна полифосфатов, иногда неравномерно окрашенные участки цитоплазмы. Оптимальная температура роста

составляет 40–45 °С. Молоко свертывает за 4–6 ч. Предельная кислотность молока достигает 200–350 °Т. Сгусток молока может иметь колющуюся или сильновязкую, слизистую консистенцию. Штаммы болгарской палочки образуют ацетальдегид, придающий сгустку характерный фруктовый запах. Штаммы болгарской палочки входят в состав заквасок для производства йогурта, простокваши «Южной», «Болгарской», «Мечниковской».

Lactobacillus acidophilus (ацидофильная палочка). Форма клеток в молоке – длинные и короткие палочки размером 3–40 мкм и толщиной 1,0–1,5 мкм. У некоторых штаммов так же, как и у болгарской палочки, в клетках наблюдается «зернистость» (зерна полифосфатов) (см. рис. 2, б). Оптимальная температура роста составляет 37–38 °С. Молоко свертывает за 5–8 ч, предельная кислотность молока 260–280 °Т. Некоторые штаммы образуют слизистый сгусток.

Ацидофильная палочка является нормальным представителем кишечной микрофлоры человека и теплокровных животных. Поэтому она устойчива к щелочной реакции среды (рН 8,3); наличию в среде фенола (0,3–0,4 %) и желчи (20 %).

Ацидофильная палочка обладает высокой антагонистической активностью по отношению к гнилостной, условно-патогенной и патогенной микрофлоре. Она продуцирует два бактериоцина – ацидофилин и лактоцидин. В связи с этим *L. acidophilus* относят к ценным пробиотическим культурам.

Молочнокислые палочки данного вида применяют для приготовления ацидофилина, ацидофильного молока, детских кисло-молочных продуктов.

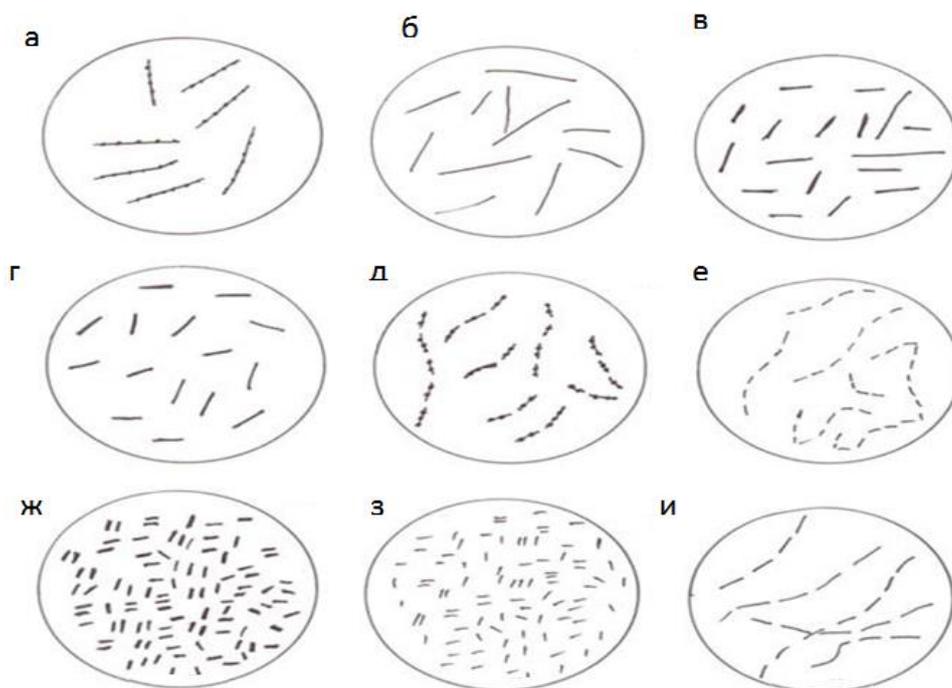


Рис. 2. Молочнокислые палочки: а – *L. bulgaricus*; б – *L. acidophilus*; в – *L. lactis*; г – *L. helveticus*; д – *L. rhamnosus*; е – *L. plantarum*; ж – *L. fermentum*; з – *L. brevis*; и – *L. casei*

Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis (молочнокислая палочка – *L. lactis*). По морфологическим и биохимическим признакам она схожа с болгарской палочкой (см. рис. 2, в). Оптимальная температура роста составляет 40–42⁰С; предельная кислотность молока, сквашенного *L. lactis*, – 160–200⁰Т. Используется в производстве сыров с высокой температурой второго нагревания.

Lactobacillus helveticus (швейцарская палочка). Палочки имеют длину 2–6 мкм и толщину 1,0–1,5 мкм; располагаются одиночно или короткими цепочками (см. рис. 2, г). Оптимальная температура их роста равна 42–45⁰С. Молоко свертывает за 5–6 ч, предельная кислотность составляет 300–350⁰Т. Штаммы *L. helveticus* можно выделить из сычуга телят. Данный вид используется в заквасках для сыров с высокой температурой второго нагревания.

Lactobacillus casei ssp. casei (*L. casei*). Палочки с прямоугольными концами размером (0,7–1,1) (2–4) мкм, располагающиеся чаще всего цепочками (см. рис. 2, д). Оптимальная температура роста составляет 28–32⁰С, при температуре 45⁰С рост прекращается.

Lactobacillus casei ssp. rhamnosus (*L. rhamnosus*). Растут в молоке в виде коротких или длинных палочек толщиной 1,5 мкм, соединенных в цепочки. Часто обнаруживается зернистость клеток. Оптимальная температура роста составляет около 30⁰С. В отличие от *L. casei* способны расти при температуре 45⁰С, размножаться в среде с содержанием 6 % NaCl и 20 % желчи. По сравнению с мезофильными лактококками протеолитическая активность *L. rhamnosus* в два раза выше. Предельная кислотность в молоке равна 80–180⁰Т. Используются в заквасках для производства следующих видов сыров: эмментальского, эдам, честер и др. Встречаются в разных видах сыров в качестве сопутствующей микрофлоры.

Lactobacillus plantarum. Палочки разной длины, соединенные в длинные и короткие цепочки (рис. 2, е). Оптимальная температура составляет около 30⁰С, предельная кислотность при развитии в молоке достигает 180⁰Т. Играет положительную роль при созревании сыров, так как может размножаться после сбраживания лактозы заквасочной микрофлорой и при концентрации NaCl до 6%.

L. plantarum используется в составе заквасок для приготовления силоса, квашеной капусты. Этот вид образует пероксид водорода и синтезирует бактериоцин плантарицин – вещество, подавляющее рост маслянокислых бактерий и кишечной микрофлоры.

Lactobacillus brevis. Мелкие палочки с закругленными концами размером (0,7–1,0) (2–4) мкм (см. рис. 2, ж).

Lactobacillus fermentum – толстые короткие палочки длиной 0,5–0,9 мкм.

Lactobacillus buchneri – палочки с закругленными концами размером (0,7–1,0) (2–4) мкм.

Палочки видов *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. buchneri* относятся к подроду *Betabacterium*. Они включены в группу облигатно-гетеро-ферментативных молочнокислых бактерий. Бета-бактерии не свертывают молоко, однако при добавлении к нему дрожжевого автолизата образуют сгусток, предельная кислотность которого может достигать 150–160⁰Т.

Сбраживают глюкозу с образованием молочной кислоты, CO₂, этанола и

незначительного количества летучих кислот. Образуют DL-изомеры молочной кислоты.

Бета-бактерии участвуют в созревании сыров с низкой температурой второго нагревания, способствуя формированию рисунка и запаха сыра. Они также встречаются в строме кефирного грибка.

Бифидобактерии

Бифидобактерии включены в семейство *Actinomycetaceae*, род *Bifidobacterium*; являются представителями нормальной микрофлоры кишечника человека и животных; обладают высокой антагонистической активностью по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам.

Морфология. Форма клеток – мелкие, иногда ветвящиеся палочки Y- или V-формы, прямые или изогнутые, булавовидные или лопатовидные (рис. 3). Микробные клетки располагаются одиночно, парами, палисадом или розетками, редко – цепочками. Размер клеток составляет (0,5–1,3) (1,5–8) мкм. Бифидобактерии по Грамму красятся положительно, не образуют эндоспор, неподвижны. Некоторые штаммы способны образовывать микрокапсулу.

Бифидобактерии являются строгими анаэробами. Оптимальная температура их роста 36–40 °С, температурные пределы роста 20–50 °С. Оптимальное значение pH среды 6–7; при pH ниже 4,5 рост бифидобактерий приостанавливается. В коровьем молоке бифидобактерии размножаются медленно, поскольку оно не является естественной средой их обитания. Для культивирования бифидобактерий в лабораторных условиях используют печеночно-цистеиновую среду Блаурока или гидролизатно-молочную среду (ГМС). После лабораторного культивирования они способны свертывать молоко через 10–12 ч. Предельная кислотность молока достигает 120–130 °Т.

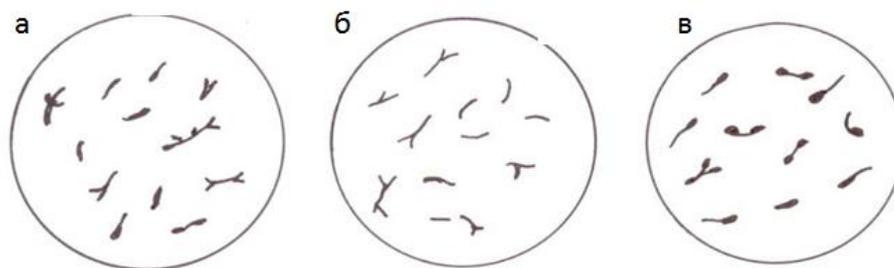


Рис. 3. Бифидобактерии:
а – *B. bifidum*; б – *B. longum*; в – *B. adolescentis*

Бифидобактерии сбраживают углеводы с образованием молочной и уксусной кислот. Штаммы бифидобактерий используют для производства детских, лечебных, и диетических кисломолочных продуктов (биоюгурта, бифидокефира, бифилакта и др.).

Пропионовокислые бактерии

Пропионовокислые бактерии относятся к семейству *Propionibacteriaceae*, роду *Propionibacterium*. Типовой вид этого рода – *Propionibacterium freudenreichii*.

Propionibacterium freudenreichii – мелкие, неподвижные, неспорообразующие, грамположительные полиморфные палочки размером (0,5–0,8) (1–5) мкм. Клетки бывают кокковидными, удлинёнными, раздвоенными или разветвленными (встречаются булавовидные формы); располагаются одиночно, парами, в виде букв V или Y.

Факультативные анаэробы. Максимальный рост наблюдается при температуре 30–37 °С и значении pH около 7,0.

В молоке пропионовокислые бактерии развиваются медленно и свертывают его через 5–7 дней. Предельная кислотность молока может достигать 160–170 °Т.

Пропионовокислые бактерии используют в сыроделии при производстве сыров с высокой температурой второго нагревания. После окончания молочнокислого брожения в сырах начинается стадия развития пропионовокислых бактерий. Последние в ходе пропионовокислого брожения накапливают пропионовую и уксусную кислоты и диоксид углерода. Летучие кислоты придают сырам специфический вкус и запах, а диоксид углерода формирует рисунок сыра.

Уксуснокислые бактерии

Уксуснокислые бактерии (ацетобактерии) относятся к роду *Acetobacter*, включающему семь видов. Типовой вид – *Acetobacter aceti*. *Acetobacter aceti* – мелкие грамотрицательные подвижные палочки размером (0,6–0,8) (1,0–3,0) мкм. Встречаются нитевидные, эллипсоидные или имеющие вздутие формы. Располагаются одиночно или цепочками. Спор и капсул не образуют. Строгие аэробы. Окисляют спирты в соответствующие кислоты (например, этанол в уксусную кислоту). Оптимальная температура развития 30 °С, оптимум pH 5,4–6,3. Колонии бактерий вырастают только на поверхности питательной среды, на жидких питательных средах они образуют пленку. В молоке развиваются плохо и кислоты не образуют. При доступе воздуха уксуснокислые бактерии окисляют спирт в уксусную кислоту.

Уксуснокислые бактерии входят в состав кефирных грибков. В производстве кефира они играют положительную роль при умеренном развитии; их развитие в сметане, твороге, простокваше может вызвать появление нежелательного запаха и привкуса уксусной кислоты, а также ослизнение продукта.

Дрожжи

Дрожжи играют в молочной промышленности двойную роль: одни виды принимают участие в производстве ферментированных молочных продуктов в качестве биологических агентов, вызывающих спиртовое брожение; другие виды способствуют порче молочных продуктов.

Дрожжи, присутствующие в молочных продуктах, условно подразделяют на три группы:

- дрожжи, сбраживающие лактозу. К ним относятся спорогенные (спорообразующие) дрожжи видов *Saccharomyces lactis*, *Zygosaccharomyces lactis*, *Kluveromyces fragilis*, *Debaryomyces* и аспорогенные (неспорообразующие) дрожжи видов *Torulopsis kefir*, *Torulopsis sphaerica*, *Candida pseudotropicalis* var. *lactosa* и др.;

- дрожжи, не сбраживающие лактозу, но ферментирующие моносахара. Такие дрожжи могут размножаться в молоке и молочных продуктах совместно с молочнокислыми бактериями, расщепляющими лактозу на глюкозу и галактозу;

- дрожжи, не ферментирующие лактозу и другие сахара, но вызывающие их окисление. Они не образуют спор и не способны к спиртовому брожению. В первую очередь к ним относятся дрожжи рода *Candida*.

Лактозосбраживающие дрожжи используют в производстве таких продуктов смешанного брожения, как кумыс, тан, айран, мацони, курунга и др. В этих продуктах они формируют специфический вкус, синтезируют витамины, стимулируют рост молочнокислых бактерий.

Некоторые штаммы дрожжей, размножающихся в молочных продуктах, обладают антагонистической активностью по отношению к возбудителю туберкулеза, а также к некоторым условно-патогенным микроорганизмам.

Отдельные виды дрожжей участвуют в созревании сыров, находясь в составе микрофлоры сырной слизи.

Дрожжи, попадающие в молочные продукты из внешних источников (так называемые «дикие дрожжи»), могут стать причиной следующих видов порчи:

1. Пигментация – появление цветных колоний на поверхности масла, сыра, творога. Образовывать колонии розового, желтого, черного цветов способны дрожжи рода *Rodotorula* (рис. 4).

2. Вспучивание творога, сметаны, йогурта, а также сыров на ранней стадии их созревания. Такой вид порчи обусловлен образованием диоксида углерода при спиртовом брожении, вызываемом дрожжами. Среди дрожжей, вызывающих порчу йогурта, выделены следующие виды: *Torulopsis candida*, *Kluveromyces fragilis*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida crusei*, *Saccharomyces cerevisiae* (рис. 5).

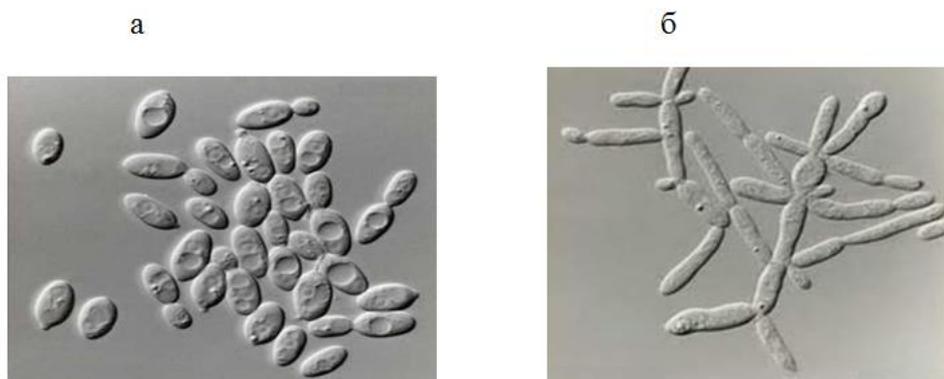


Рис. 4. Дрожжи рода *Rodotorula*: а – *Rodotorula rubra*; б – *Rhodotorula mucilaginosa*

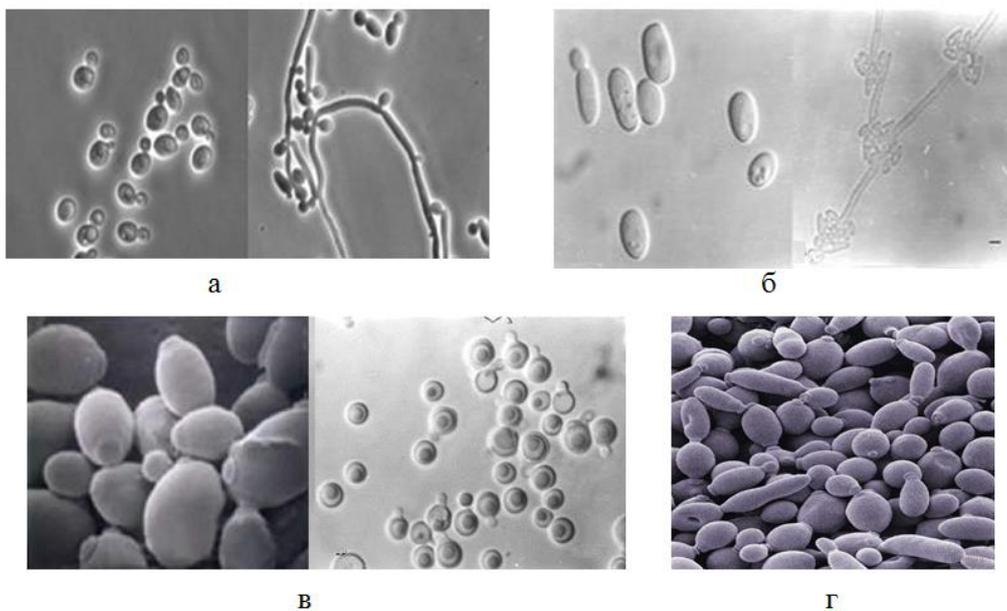


Рис. 5. Дрожжи, вызывающие порчу йогурта: а – *Torulopsis candida*; б – *Kluyveromyces fragilis*; в – *Candida crusei*; г – *Saccharomyces cerevisiae*

3. Бомбаж сгущенного молока с сахаром. Такой вид порчи вызывают дрожжи, сбрасывающие сахарозу.

4. Прогоркание, осаливание, появление неприятного запаха в жиросодержащих продуктах при их холодильном хранении вызывают дрожжи *Yarrowia lipolytica*, обладающие липолитической активностью (рис. 6).

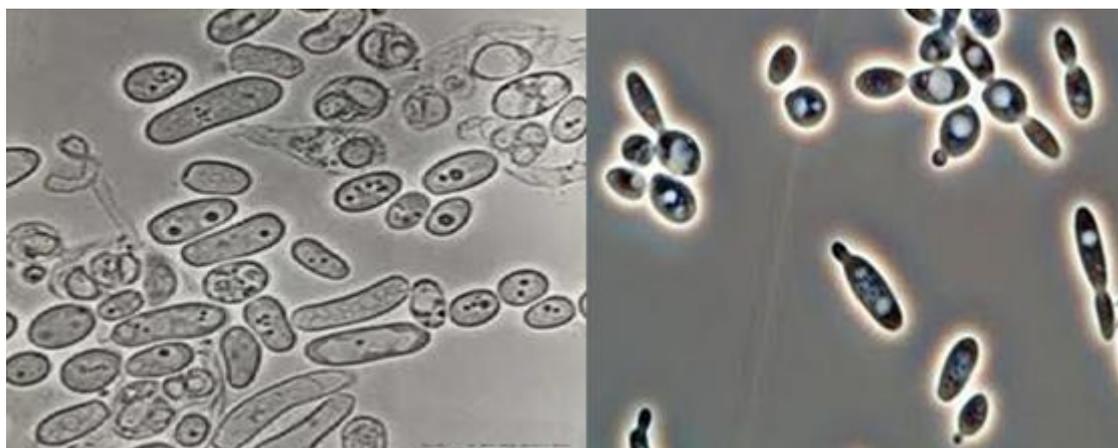


Рис. 6. Дрожжи *Yarrowia lipolytica*

Контрольные вопросы

1. Какова систематическая принадлежность молочнокислых бактерий?
2. Охарактеризуйте морфологические свойства молочнокислых стрептококков, лейкопалочек, молочнокислых палочек.
3. В чем отличие гомоферментативного молочнокислого брожения от гетероферментативного?

4. Перечислите виды гомоферментативных молочнокислых бактерий.
5. Какие виды гетероферментативных молочнокислых бактерий Вам известны?
6. Где обитают молочнокислые бактерии?
7. Какова роль молочнокислых бактерий в формировании качества молочных продуктов?
8. Какие дрожжи встречаются в молоке и молочных продуктах?
9. На какие группы делятся дрожжи в зависимости от способности сбраживать лактозу?
10. Какова роль дрожжей в формировании качества молочных продуктов?
11. В каком продукте уксуснокислые бактерии входят в состав полезной микрофлоры?
12. Какова роль пропионовокислых бактерий в формировании качества твердых сыров?
13. Перечислите морфологические и физиологические свойства бифидобактерий
14. Какую роль выполняют бифидобактерии в организме?

ТЕМА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО КОЛИЧЕСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ В МОЛОКЕ

Задание: Ознакомиться с методами определения общего количества микроорганизмов в свежем пастеризованном молоке. Определить свежесть молока пробой на редуктазу с метиленовым голубым и с резазурином. Определить антибиотики в молоке.

Молоко, представляющее собой один из наиболее полноценных продуктов питания, в то же время является хорошей питательной средой для развития и размножения микроорганизмов. Основными источниками попадания микробов в молоко являются вымя и кожный покров животного, руки доильщика, посуда, воздух и др.

В процессе хранения молока микроорганизмы изменяют его свойства. Для более длительного сохранения первоначальных свойств молока необходимо снижать до минимума возможности попадания в него микроорганизмов в процессе хранения и транспортирования.

При исследовании необходимо обращать внимание на количественный состав микрофлоры молока. Это дает возможность правильно вести борьбу с возбудителями порчи молока.

В молоко при нарушении санитарных требований могут попасть бактерии кишечной группы, маслянокислые, гниlostные (аэробы, анаэробы), дрожжи и плесневые грибы, которые вызывают различные пороки молока и молочных продуктов.

Отбор проб молока

Для бактериологического исследования молоко отбирают в стерильную колбу после тщательного перемешивания в количестве 50 мл. Измеряют температуру продукта и охлаждают до 6°C.

Определение общего количества микроорганизмов

При определении общего количества микроорганизмов в молоке рекомендуются следующие нормы разведения:

- Молоко сырое - 1:10000; 1:100000; 1:1000000.
- Молоко пастеризованное - 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000.

Чтобы получить разведение 1:10 пробирку с продуктом, предназначенным для исследования, и пробирку со стерильной водой берут в левую руку и держат в наклонном положении между большим и указательным пальцами. Ватные пробки из пробирок вынимают около пламени горелки и помещают одну между средним и безымянным пальцами левой руки, а другую захватывают мизинцем правой руки, после чего обжигают края обеих пробирок и вводят, стерильную пипетку в пробирку с исследуемым материалом. Набирают 1 мл и переносят в пробирку со стерильной водой. Содержимое выдувают и еще несколько раз набирают из этой же пробирки воду, промывают пипетку, чтобы на стенках ее не осталось материала, предназначенного для исследования. Вынимают пипетку, обжигают края пробирки, внутренние концы пробок и затем закрывают ими пробирки. Для дальнейшего разведения берут другую стерильную пипетку и, набрав 1 мл из пробирки с 1 разведением, переносят его во вторую пробирку со стерильной водой. Получается разведение 1:100. Новой стерильной пипеткой делают следующее, 3 разведение и т.д.

По 1 мл соответствующих разведений высеивают в чашки Петри и заливают горячей питательной средой температурой 45°C (сусло-агар, МПА) в количестве 12-15 мл. Сразу после заливки содержимое тщательно перемешивают путем легкого покачивания для равномерного распределения посевного материала. Выращивание ведут в течение двух суток при температуре 37°C.

Для определения общего количества бактерий следует выбирать те разведения, при посевах которых на чашках вырастает не менее 50 и не более 300 колоний. Количество выросших колоний подсчитывают в каждой чашке, поместив ее вверх дном (без крышки) на темном фоне, пользуясь лупой с увеличением в 8-10 раз. Каждую подсчитанную колонию отмечают на дне чашки чернилами. При подсчете колоний рекомендуется пользоваться счетчиками. При большом числе колоний и их равномерном распределении дно чашки Петри делят на четыре и более одинаковых сектора, подсчитывают число колоний в двух-трех секторах, находят среднее арифметическое число колоний для них и умножают на общее количество секторов всей чашки.

Таким образом, находят общее количество колоний, выросших на одной чашке.

Для подсчета общего количества бактерий в 1 мл или 1 г образца число колоний, выросших на каждой чашке, умножают на соответствующее разведение.

Полученные результаты по отдельным чашкам складывают, делят на количество подсчитанных чашек и выводят среднее арифметическое, которое принимают за окончательный результат. Полученные числа округляют.

Проба на редуктазу

Для определения бактериальной чистоты и свежести молока проводят пробу на редуктазу, основанную на способности бактерий выделять редуктазу, восстанавливающую краски (метиленовый синий, резазурин). Обесцвечивание метиленового синего и резазурина наступает тем быстрее, чем больше микробов в молоке. По скорости обесцвечивания краски молоко разделяют на 4 класса (таблица 1).

Таблица 1

Показатель	Класс			
	1	2	3	4
Время восстановления	Более 5,5 ч.	5,5-2 ч.	2 ч. 20 мин.	Менее 20 мин.
Качество молока	Хорошее	Среднего качества	Плохое	Очень плохое
Количество микроорганизмов в 1мл молока	Менее 500 тыс.	От 500 тыс. до 4млн.	От 4 млн. до 20 млн.	Более 20 млн.

Постановка пробы

В пробирки наливают 20мл молока и 1мл метиленового синего или 10мл молока и 0,5мл метиленового синего. После тщательного смешивания пробирки помещают в водяную баню или термостат при температуре 38-40°C. Такую температуру поддерживают в течение всего опыта до полного обесцвечивания молока. Первые 20 мин наблюдения ведут непрерывно, в дальнейшем просмотр пробирок производят периодически через каждые 15-30 мин.

Приготовление раствора метиленового синего

5мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего прибавляют к 195мл дистиллированной воды. Смесь хорошо перемешивают. Срок хранения полученного раствора не более 7 суток.

Метод широко используется ввиду простого выполнения и быстрого получения результатов.

Редуктазная проба с резазурином

В стерильные пробирки вносят по 1мл рабочего раствора резазурина и по 10мл исследуемого молока, закрывают корковыми пробками, смешивают путем трехкратного переворачивания пробирок. Пробирки помещают в водяную баню с температурой воды 38°C и защищают от действия прямых солнечных лучей. Время погружения пробирок в водяную баню считают началом анализа. Показания снимают через 20 минут и через 1 час, не встряхивая и не переворачивая пробирки. Через 20 минут пробирки с обесцвеченным молоком удаляют из во-

дной бани. Появление окрашивания молока в этих пробирках при встряхивании не учитывается. Оставшиеся пробирки однократно переворачивают и оставляют в бане до конца анализа. В зависимости от времени обесцвечивания и изменения окраски молоко относят к одному из четырех классов.

Таблица 2

Класс	Качество молока	Продолжительность изменения цвета	Цвет молока	Количество бактерий в 1 мл молока
1	Хорошее	Через 1 ч	Сине-стальной	Менее 500 тыс.
2	Удовлетворительное	Через 1 ч	Сиреневый или сине-фиолетовый	От 500 тыс. до 4 млн.
3	Плохое	Через 1 ч	Розовый или белый	От 4 млн. до 20 млн.
4	Очень плохое	До 20 мин	Белый	Свыше 20 млн.

Определение антибиотиков в молоке

Антибиотики (пенициллин, тетрациклин, стрептомицин и др.) попадают в молоко при лечении мастита у коров. Они нарушают молочнокислое брожение. Для установления наличия антибиотиков и моющих или дезинфицирующих средств в молоке используют прямые и косвенные методы.

Метод прямого микроскопирования. Метод основан на подавлении размножения бактерий и изменении их формы под действием антибиотиков.

В пробирку отбирают 10мл исследуемого молока, закрывают корковой пробкой и помещают в водяную баню при температуре 80-85°C на 5 минут. Затем быстро охлаждают до 40°C. В контрольную пробирку отбирают 10мл молока, которое заведомо не содержит антибиотиков. В обе пробирки добавляют по 3-4 капли свежей культуры, чувствительной к антибиотикам, термофильного стрептококка, выращенного на гидролизованном или обезжиренном молоке. Тщательно встряхнув закрытые пробками пробирки помещают в водяную баню при температуре 40°C на 90 минут. Затем микроскопируют окрашенные препараты с иммерсионным объективом. На присутствие антибиотиков указывает резкое уменьшение количества клеток в испытуемом молоке по сравнению с контролем, наличие утолщенных форм клеток и их скопление.

Метод восстановления индикаторов

а) Использование метиленового синего.

В пробирки с исследуемым и контрольным молоком вносят по 1мл раствора метиленового синего и затем 3-4 капли свежей культуры чувствительного к антибиотикам термофильного стрептококка. Встряхнув, пробирки ставят в водяную баню при температуре 38-40°C на 5,5 часов. Следят за изменением цвета в исследуемом образце по сравнению с контролем, который должен восстанавливаться. Наличие синего цвета в исследуемом молоке указывает на присутствие антибиотиков.

б) Использование резазурина.

В пробирки с исследуемым и контрольным молоком вносят по 1мл раствора резазурина; 3-4 капли чувствительного к антибиотикам термофильного стрептококка, перемешивают и ставят в водяную баню на 45 минут. Отмечают изменение цвета исследуемого образца по сравнению с контролем. Фиолетово-розовый или сине-стальной цвет молока указывает на присутствие антибиотиков.

Контрольные вопросы

1. Источники попадания микрофлоры в молоко.
2. Значение микробиологического контроля в молочной промышленности.
3. Отбор молока для бактериологического исследования.
4. Методы определения общего количества микроорганизмов.
5. Метод определения эффективности пастеризации.
6. Определение молочнокислых бактерий в молоке.

ТЕМА 4. МИКРОБИОЛОГИЯ ЗАКВАСОК

Задание: Определить пригодность молока для закваски. Провести проверку эффективности пастеризации молока для закваски. Исследовать приготовленную закваску, пользуясь схемой контроля заквасок (рис. 7). Полученные данные представить в виде таблицы. Дать заключение о пригодности закваски для использования в производстве. Приготовить микроскопические препараты кефирного грибка, грибковой и производственной закваски, рассмотреть их под микроскопом и зарисовать. Указать, какие группы микроорганизмов преобладают, а какие из них встречаются редко.

Заквасками, или стартовыми культурами, называют монокультуры или комбинации культур микроорганизмов, используемые для приготовления ферментированных молочных продуктов, кисломолочного масла и сыров. В качестве заквасок чаще всего используют молочнокислые бактерии; иногда в состав заквасок включают пропионовокислые, уксуснокислые бактерии или бифидобактерии.

Закваски бывают одноштабмовыми, состоящими только из одного штамма микроорганизма, многоштабмовыми, состоящими из нескольких штаммов одного вида микроорганизма, и многовидовыми (смешанными), в состав которых входят несколько штаммов разных видов микроорганизмов. Исключение составляет кефирная закваска, которая готовится на кефирных грибках, представляющих собой естественный симбиоз различных микроорганизмов.

Закваски различают следующим образом:

- маточные (или лабораторные), приготавливаемые на биофабриках;
- материнские (первичные), получаемые при пересеве маточной закваски;
- промежуточные (вторичные), получаемые путем пересева материнской закваски;

–производственные (третичные), которые готовятся на основе материнских или промежуточных заквасок.

Материнскую и иногда промежуточную закваски готовят на стерилизованном молоке, вторичную и третичную закваски – на пастеризованном молоке.

В производственных условиях используют жидкие закваски, получаемые из маточных путем нескольких пересадок. В последние годы находят широкое применение замороженные и сухие закваски прямого внесения, представляющие собой замороженную или высушенную сублимационным методом биомассу молочнокислых и других групп бактерий.

Определение пригодности молока для закваски

Молоко, используемое для приготовления заквасок, не должно содержать ингибиторов роста молочнокислых бактерий.

Пригодность молока для заквасок определяют пробами с резазурином или метиленовым синим.

Проба с резазурином. В чистую стерильную пробирку наливают 10 см³ исследуемого молока и закрывают стерильной резиновой пробкой. Одновременно проводят контрольный анализ, для чего в пробирку наливают 10 см³ восстановленного препарата СКИВ.

Пробирки с исследуемым молоком и контрольной пробой нагревают на водяной бане до температуры (87±2) °С и выдерживают 10 мин, затем охлаждают до температуры (47±1) °С. После этого в пробирки стерильной пипеткой вносят 0,3 см³ рабочей тест-культуры (*Streptococcus thermophilus*).

Содержимое пробирок тщательно перемешивают трехкратным перевертыванием. Затем пробирки выдерживают в течение 1 ч 15 мин при температуре (46±1) °С в редуктазнике или водяной бане.

По истечении 1 ч 15 мин в пробирки с исследуемым молоком и контрольной пробой вносят по 1 см³ основного раствора резазурина. Содержимое пробирок перемешивают путем двукратного перевертывания. Пробирки снова помещают в редуктазник и выдерживают еще 10 мин при температуре (46±1) °С.

Если молоко件годно для закваски, содержимое пробирок будет иметь розовый или белый цвет.

Проба с метиленовым синим. Перед проведением анализа готовят смесь следующего состава: 20 см³ водного раствора пептона; 3,5 см³ односуточной культуры термофильного стрептококка и 0,1 см³ водного раствора метиленового синего. Смесь хорошо перемешивают.

В чистую стерильную пробирку наливают 10 см³ исследуемого молока, закрывают (неплотно) стерильной резиновой пробкой. Пробирку с исследуемым молоком нагревают на водяной бане до температуры (87 ± 2) °С с выдержкой 10 мин, затем охлаждают до температуры (43±2) °С. После этого в пробирку стерильной пипеткой вносят 2 см³ приготовленной смеси (описанной выше), перемешивают (пробирку трехкратно перевертывают) и выдерживают на водяной бане при температуре 41–42 °С в течение 2 ч.

Если молоко件годно для закваски, метиленовый синий обесцвечивается.

Проверка эффективности пастеризации молока для закваски

Для приготовления производственной закваски молоко пастеризуют при температуре $(95 \pm 2) ^\circ\text{C}$ с выдержкой (30 ± 5) мин. Во время выдержки молоко должно перемешиваться для равномерного прогрева всей массы. При неправильно проведенной пастеризации в молоке могут оставаться посторонние микроорганизмы (энтерококки и термоустойчивые молочнокислые палочки).

Эффективность пастеризации молока определяют по методу Королевой следующим образом. После пастеризации отбирают пробы молока в стерильную посуду и выдерживают их в термостате при температуре $40\text{--}45 ^\circ\text{C}$ в течение 24-48 ч. После этого отмечают характер сгустка в пробах и готовят микроскопические препараты сгустков, окрашивая их метиленовым синим.

В зависимости от результатов исследования можно сделать следующее заключение:

- если сгусток довольно плотный, а в микроскопическом препарате обнаруживается значительное количество кокков, значит, пастеризация проведена при температуре ниже $90 ^\circ\text{C}$, т. е. нарушен температурный режим пастеризации молока для закваски;
- если сгусток слабый, а в микроскопическом препарате обнаруживаются зернистые и незернистые палочки, значит, пастеризация проведена при недостаточной выдержке или молоко плохо перемешивалось;
- если сгусток рваный, произошла пептонизация молока, а в микроскопическом препарате обнаруживается большое количество спорных палочек, значит, пастеризация проведена правильно.

Общие правила приготовления заквасок для различных молочных продуктов

Приготовление закваски проводят в боксе при микробиологической лаборатории или в специальных помещениях для приготовления производственной закваски (заквасочных). В помещениях, где готовят закваску, необходимо строго поддерживать чистоту: пол и стены необходимо ежедневно протирать раствором хлорной извести, воздух стерилизовать бактерицидными лампами. Рабочий стол в боксе обрабатывают ватным тампоном, смоченным спиртом.

Лица, готовящие закваску, должны работать в чистой спецодежде и обуви, используемой только для этих целей.

Для приготовления закваски в подготовленное стерилизованное или пастеризованное молоко вносят от 0,5 до 3 % посевного материала от массы заквашиваемого молока.

Контроль качества заквасок

Качество закваски проверяют ежедневно по ее активности, содержанию продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, а также по микробиологическим и органолептическим показателям (рис. 7).

Активность закваски определяют по продолжительности сквашивания пастеризованного молока при внесении в него 5 % закваски. Для закваски на основе молочнокислых стрептококков продолжительность сквашивания молока не

должна превышать 7 ч, а для закваски на основе молочнокислых палочек – 6 ч.

Контроль по микробиологическим показателям включает в себя микроскопию препарата закваски, определение наличия бактерий группы кишечной палочки (БГКП), споровых бактерий и бактериофага.

Контроль закваски по микроскопическому препарату проводят ежедневно, при этом просматривают не менее 10 полей зрения, проверяя чистоту закваски и соотношение между ее компонентами. Если возникает сомнение в микробиологической чистоте закваски, а при микроскопировании не удастся обнаружить посторонних микроорганизмов, делают посев первых четырех–пяти разведений закваски в стерильное молоко и после инкубации просматривают микроскопические препараты сгустков.

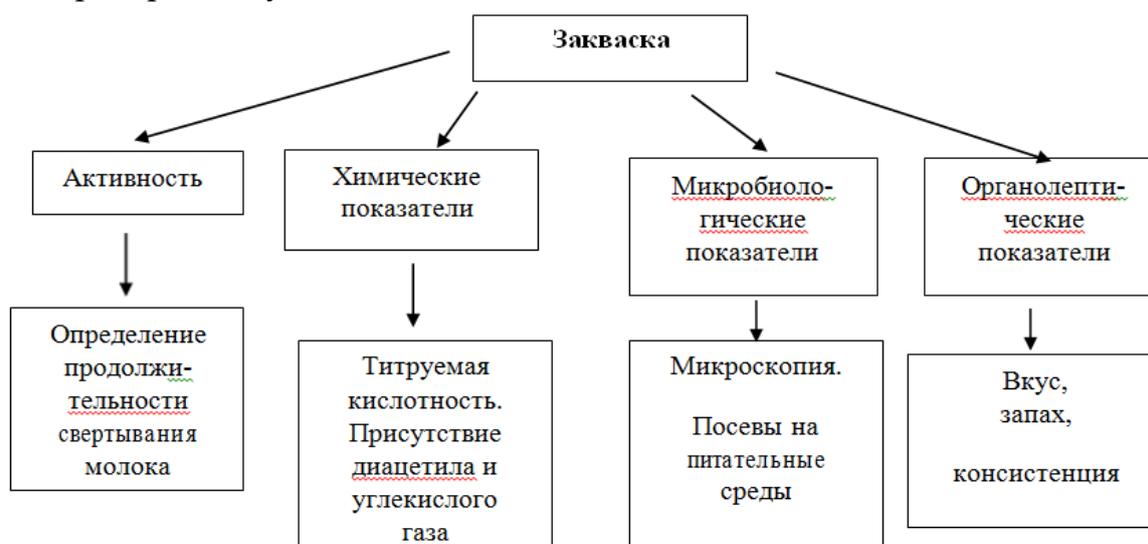


Рис. 7. Контроль качества заквасок

Наличие БГКП в закваске устанавливают путем посева ее в среду Кесслера. Они должны отсутствовать в 3 см³ закваски для кефира и в 10 см³ закваски для остальных продуктов.

Присутствие споровых бактерий определяют следующим образом. В две пробирки со стерильным молоком заливают по 1 см³ закваски (в одну пробирку добавляют кусочек парафина) и прогревают их на водяной бане при температуре 85 °С с выдержкой 10 мин. Затем пробирки охлаждают и выдерживают в термостате при температуре 30 °С в течение двух суток. При развитии споровых анаэробных бактерий парафиновая пробка поднимается.

В молоке при развитии споровых аэробных и анаэробных бактерий может наблюдаться пептонизация, в микроскопическом препарате видны утолщенные палочки, иногда со спорами.

Для определения присутствия бактериофага к 10 см³ стерильного обезжиренного молока добавляют 0,5 см³ рабочего раствора метиленового синего и одну каплю закваски. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и выдерживают при температуре 37 °С, наблюдая за восстановлением индикатора. Если после восстановления метиленового синего снова будет наблюдаться посинение молока (через 4–5 ч), то это указывает на наличие в закваске бактериофага.

К химическим показателям относятся титруемая кислотность, присутствие в закваске CO_2 и диацетила. Титруемую кислотность закваски определяют стандартным методом: в колбочку на 100 см^3 вносят 10 см^3 закваски, 20 см^3 дистиллированной воды, три капли фенолфталеина и титруют 0,1 н. раствором NaOH до появления розового окрашивания. Если кислотность закваски мезофильных стрептококков превышает допустимую ($90 \text{ }^\circ\text{T}$), то ее следует проверить на наличие термоустойчивых молочнокислых палочек – возбудителей порока молочных продуктов «излишняя кислотность».

Углекислота и четырехуглеродные соединения являются продуктами жизнедеятельности ароматобразующих бактерий *Lac. diacetylactis* и лейконостоков. Присутствие в закваске этих веществ свидетельствует о нормальном развитии ароматобразующих культур.

Определение диоксида углерода. Производственную закваску хорошо перемешивают, отбирают 20 см^3 в пробирку диаметром 15 мм и, отметив уровень закваски, ставят пробирку в водяную баню с холодной водой. Воду нагревают до $90 \text{ }^\circ\text{C}$ и, не вынимая пробирки из палочки встречаются реже, чем в грибковой закваске, дрожжи обнаруживаются не в каждом поле зрения (рис. 8, в).

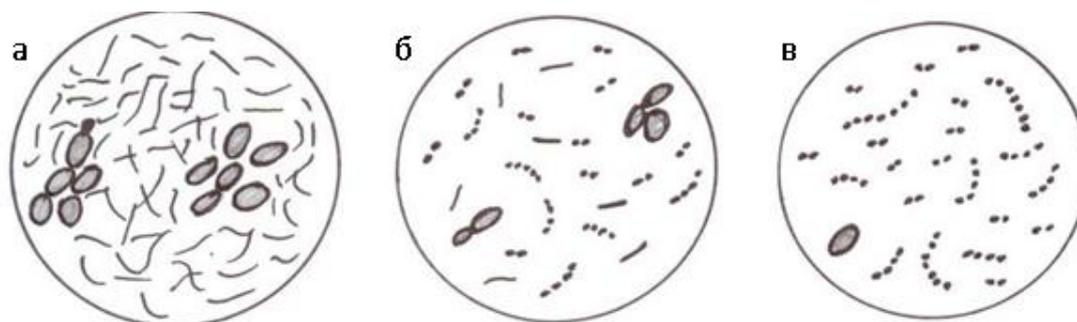


Рис. 8. Микроскопическая картина: а – стромы кефирного грибка; б – грибковой закваски; в – кефирной производственной закваски

Контрольные вопросы

1. Какие факторы учитывают при подборе культур молочнокислых бактерий для заквасок?
2. Что представляют собой сухие и жидкие закваски молочнокислых бактерий и как их готовят?
3. В чем достоинства и недостатки жидких и сухих заквасок?
4. В чем отличие заквасок от бактериальных концентратов?
5. Какова продолжительность хранения сухих и жидких заквасок и бактериальных концентратов?

ТЕМА 5. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРОГО МОЛОКА

Задание: Определить бактериальную обсемененность сырого молока по редуктазной пробе. Определить КМАФАнМ и БГКП в сыром молоке. Провести

групповой анализ микрофлоры сырого молока путем посева его разведений на различные питательные среды для учета количества молочнокислых, протеолитических, липолитических, маслянокислых бактерий, дрожжей и плесеней.

Отбор проб молока

Пробы для микробиологического исследования отбирают в стерильную посуду с помощью стерильных приспособлений. Объединенную пробу объемом 500 см^3 составляют из точечных проб, отобранных из каждой фляги или цистерны после органолептической оценки молока и рассортировки его по кислотности.

Проба на редуктазу

Редуктазная проба является косвенным методом определения количества бактерий в молоке. Метод основан на восстановлении индикатора (метиленового синего или резазурина) окислительно-восстановительными ферментами микроорганизмов, выделяемыми в молоко. По продолжительности изменения окраски молока оценивают степень его контаминации посторонними микроорганизмами.

Редуктазная проба с метиленовым синим

В стерильную большую пробирку наливают 1 см^3 рабочего раствора метиленового синего и 20 см^3 исследуемого молока. Пробирку закрывают резиновой пробкой и ее содержимое смешивают путем медленного трехкратного переворачивания пробирки. Пробирку помещают в редуктазник или водяную баню с температурой воды $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Вода в редуктазнике или водяной бане после погружения пробирки с молоком должна доходить до уровня жидкости в пробирке или быть немного выше. Момент погружения пробирок в редуктазник считают началом анализа. Наблюдение за изменением окраски ведут через 40 мин; 2,5 и 3,5 ч с начала проведения анализа. Окончанием анализа считают момент обесцвечивания окраски молока, при этом остающийся небольшой кольцеобразный окрашенный слой сверху (шириной не более 1 см) или небольшая окрашенная часть внизу пробирки (высотой не более 1 см) в расчет не принимаются. Появление окрашивания молока в этих пробирках при встряхивании не учитывают (табл. 3).

Редуктазная проба с резазурином

Пробу с резазурином следует проводить не ранее чем через 2 ч после доения.

В пробирку наливают 1 см^3 рабочего раствора резазурина и 10 см^3 исследуемого молока, закрывают резиновой пробкой и смешивают путем медленного трехкратного перевертывания пробирки. Дальнейшая последовательность анализа такая же, как и в пробе с метиленовым синим. Пробирка с молоком и резазурином на протяжении анализа должна быть защищена от прямых солнечных лучей (редуктазник следует плотно закрыть крышкой).

Наблюдение за изменением окраски проводят через 1 и 1,5 ч. По истечении 1 ч пробирку вынимают из редуктазника. Если молоко имеет серо-сиреневую окраску, пробирку оставляют в редуктазнике еще на 30 мин.

**Оценка степени обсемененности молока микроорганизмами
по продолжительности изменения окраски молока
с метиленовым синим или резазурином**

Класс	Проба с метиленовым синим	Проба с резазурином		Ориентировочное количество бактерий в 1 см ³ молока, КОЕ
	продолжительность обесцвечивания метиленового синего, ч	продолжительность изменения, цвета, ч	окраска молока	
Высший	Более 3,5	1,5	Серо-сиреневая до сиреневой	До 300 тыс.
I	3,5	1,0	То же	От 300 до 500 тыс.
II	2,5	1,0	Сиреневая с розовым оттенком	От 500 тыс. до 4 млн
III	40 мин	1,0	Бледно-розовая или белая	От 4 до 20 млн

В зависимости от продолжительности изменения цвета молоко относят к одному из четырех классов, указанных в табл. 3.

**Определение количества мезофильных аэробных
и факультативно-анаэробных микроорганизмов**

Метод основан на способности мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов размножаться на плотном питательном агаре при температуре $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 72 ч. Количество засеваемого продукта устанавливают с учетом наиболее вероятного микробного обсеменения.

При исследовании сырого молока в питательную среду засевают его разведения от 10^{-4} до 10^{-6} см³. По 1 см³ каждого разведения засевают в две чашки Петри с заранее маркированной крышкой и заливают 10–15 см³ расплавленного и остуженного до 40–45 °С мясопептонного агара (МПА). Сразу после заливки агара содержимое чашки Петри тщательно перемешивают путем легкого покачивания для равномерного распределения посевного материала. После застывания агара чашки Петри переворачивают крышками вниз и ставят в таком виде в термостат с температурой $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ на 72 ч.

Количество выросших колоний подсчитывают на каждой чашке, поместив ее вверх дном на темном фоне, пользуясь лупой с увеличением в 4–10 раз. При большом числе колоний и равномерном их распределении в питательном агаре дно чашки Петри делят на четыре и более одинаковых секторов, подсчитывают число колоний в 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.

Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в 1 см³ молока X вычисляют по формуле:

$$X = n \cdot 10^m,$$

где n – количество колоний, подсчитанных на чашке Петри; m – число десятикратных разведений.

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое, полученное по всем чашкам.

Определение бактерий группы кишечных палочек

В настоящее время к БГКП относят следующие роды из семейства *Enterobacteriaceae*: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*.

Бактерии группы кишечных палочек представляют собой мелкие грамотрицательные палочки, в основном подвижные (кроме бактерий рода *Klebsiella*), не образующие эндоспор и капсул. Они не обладают оксидазной активностью, ферментируют лактозу и глюкозу с образованием кислоты и газа при температуре 37 °С. Исследование на присутствие БГКП в молочных продуктах проводят в несколько этапов.

Определение бродильного титра. Метод основан на способности БГКП сбраживать в питательной среде лактозу с образованием кислоты и газа при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч. В молочной промышленности для определения бродильного титра используют среду Кесслера, в которую в качестве углевода вносят лактозу; в качестве вещества, ингибирующего рост других групп бактерий, – бычью желчь, а в качестве индикатора – генцианвиолет.

Бродильный титр в сыром молоке определяют следующим образом. В пять пробирок со средой Кесслера вносят по 1 см³ соответствующего разведения молока (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) и ставят их в термостат при температуре (37 ± 1) °С на 18–24 ч. По окончании инкубации пробирки просматривают. При отсутствии газообразования в поплавке в пробирке с наименьшим из засеваемых объемов дают заключение об отсутствии в продукте БГКП. При наличии газообразования в поплавке в пробирке с наименьшим из засеваемых объемов считается, что БГКП обнаружены в этом количестве.

Пересев БГКП на среду Эндо. Для подтверждения принадлежности бактерий, вызвавших брожение в среде Кесслера, материал из забродивших пробирок пересевают на среду Эндо. С этой целью дно чашки Петри с застывшей средой Эндо делят карандашом по стеклу на 4 или 8 секторов. Из пробирок со средой Кесслера берут петлей немного жидкости и проводят ею расширяющимся зигзагом штрих по поверхности агара, начиная от центра сектора к краю чашки. Для получения изолированных колоний петлю не отрывают от поверхности агара. Чашки Петри переворачивают вверх дном и ставят в термостат при температуре (37 ± 1) °С. После 24 ч инкубации определяют характер выросших колоний. На среде Эндо БГКП образуют блестящие красные или розовые колонии с металлическим блеском или без него.

Окрашивание препаратов из характерных колоний по Граму. Не менее чем из пяти колоний готовят мазки и окрашивают их по Граму. Бактерии группы кишечных палочек – грамотрицательные, неспорообразующие. Микробиологические показатели сырого молока приведены в табл. 4.

Допустимые уровни содержания микроорганизмов в сыром молоке

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются		Примечание
		БГКП (колиформы)	патогенные, в том числе сальмонеллы	
Высший сорт	$1 \cdot 10^5$	–	25	Соматические клетки, не более $4 \cdot 10^5$ в 1 см^3
Первый сорт	$5 \cdot 10^5$	–	25	Соматические клетки, не более $1 \cdot 10^6$ в 1 см^3
Второй сорт	$4 \cdot 10^6$	–	25	Соматические клетки, не более $1 \cdot 10^6$ в 1 см^3

Групповой количественный учет микроорганизмов в сыром молоке.

В целях детального исследования микрофлоры сырого молока проводят определение основных групп микроорганизмов, наиболее часто встречающихся в молоке. При этом для учета отдельных групп микроорганизмов используют различные селективные питательные среды или особые условия культивирования.

Количественный учет молочнокислых бактерий

Молочнокислые бактерии, размножаясь в сыром молоке, накапливают молочную кислоту, что приводит к повышению титруемой кислотности молока и ухудшению его технологических свойств. Для определения количества молочнокислых бактерий делают посев разведений сырого молока в чашки Петри, в которые перед стерилизацией вносят по 0,5 г тонко измельченного мела. После этого чашки заливают расплавленным и остуженным до температуры 45–50 °С агаром с гидролизованым молоком. После застывания агара чашки переворачивают вверх дном и ставят в термостат с температурой (35±1) °С на 36–48 ч. После инкубации подсчитывают количество колоний молочнокислых бактерий по зонам просветления вокруг них, которые появляются за счет образования растворимого лактата кальция.

Количественный учет протеолитических бактерий

Протеолитические бактерии разлагают белки молока с образованием пептонов и пептидов, поэтому присутствие их в молоке и молочных продуктах крайне нежелательно. Они вызывают появление в молочных продуктах горького вкуса.

Метод определения протеолитических бактерий основан на их способности расщеплять белки под действием протеолитических ферментов. Для определения количества протеолитических бактерий производят посев по 1 см^3 каждого из выбранных разведений молока в стерильные чашки Петри, которые затем заливают расплавленным и остуженным до температуры 45–50 °С молочным агаром.

После застывания агара чашки с посевами выдерживают в термостате при

температуре (30±1) °С в течение 36–48 ч, а затем подсчитывают количество колоний протеолитических бактерий по зонам просветления вокруг них, образующихся вследствие разложения молочного белка.

К наиболее распространенным протеолитическим бактериям относятся псевдомонады, палочки протей, большинство спорообразующих бактерий.

Количественный учет маслянокислых бактерий

Маслянокислые бактерии при развитии в молочных продуктах вызывают такие пороки, как вспучивание, неприятный вкус и запах (вследствие накопления масляной и уксусной кислот и CO₂).

Учет маслянокислых бактерий производят методом предельных разведений, высевая разведения исследуемого продукта в пробирки со стерильным молоком и парафином. После посева пробирки нагревают в водяной бане при температуре 85 °С в течение 10 мин, охлаждают до 30 °С и выдерживают в термостате при температуре 30 °С в течение трех суток.

Наличие маслянокислых бактерий определяют по трем признакам:

- образованию газа;
- запаху масляной кислоты;
- наличию в микроскопическом препарате спорообразующих бактерий, имеющих форму барабанных палочек и дающих положительную реакцию на гранулезу (запасное крахмалоподобное вещество).

Для обнаружения гранулезы каплю взвеси исследуемых микробов наносят на предметное стекло, смешивают с каплей раствора Люголя и накрывают покровным стеклом. Гранулеза, содержащаяся в клетках, окрашивается йодом в синий цвет.

Определение основных групп микроорганизмов, наиболее часто встречающихся в сыром молоке, приведено в табл. 5.

Таблица 5

Определение основных групп микроорганизмов в сыром молоке

Определяемый показатель	Метод исследования	Используемая питательная среда	Засеваемое разведение молока	Количество чашек (или пробирок)	Результат исследования
Количество бактерий: молочно-кислых протеолитических	Чашечный	Агар с гидролизованым молоком и мелом	4	1	
			5	1	
			6	1	
	Чашечный	Молочный агар	2	1	
			3	1	
			4	1	
масляно-кислых	Предельных разведений	Стерильное молоко с добавлением парафина	1	2	
			2	2	
			3	2	
			4	2	
липолитических	Чашечный	Питательный агар с говяжьим жиром	1	1	
			2	1	
			3	1	
Количество дрожжей и плесеней	Чашечный	Сусло-агар или среда Сабуро	0	1	
			1	1	
			2	1	

Количественный учет липолитических бактерий

Липолитическими называют микроорганизмы, способные разлагать жир, что приводит к появлению различных пороков вкуса и запаха молочных продуктов. Липолитически активными являются некоторые виды бактерий (чаще всего псевдомонады), дрожжи, плесневые грибы.

Для определения липолитических бактерий на дно чашки Петри заливают стерильный расплавленный говяжий жир и тут же его сливают. На дне остается тонкий слой застывшего жира. В эту же чашку Петри вносят 1 см³ исследуемого разведения молока и заливают расплавленным и остуженным до температуры 45–50 °С питательным агаром. После застывания агара чашки с посевами выдерживают при комнатной температуре (20 ± 2) °С в течение пяти-шести суток. Подсчитывают количество колоний липолитических микроорганизмов, вокруг которых образовались белые зоны.

Количественный учет дрожжей и плесеней

Учет дрожжей и плесеней в молоке производят посевом соответствующих разведений молока в чашки Петри, которые затем заливают расплавленным и остуженным до температуры 45–50 °С суслон-агаром или средой Сабуро. Чашки выдерживают в термостате при температуре (30 ± 2) °С в течение трех суток. Подсчитывают отдельно количество колоний дрожжей и колоний плесеней.

Контрольные вопросы

1. Источники попадания микрофлоры в молоко.
2. Значение микробиологического контроля в молочной промышленности.
3. Отбор молока для бактериологического исследования.
4. Методы определения общего количества микроорганизмов.
5. Определение молочнокислых бактерий в молоке.
6. Определение дрожжей и плесневых грибов в молочных продуктах.
7. Показатели для определения категории молока.

ТЕМА 6. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПИТЬЕВОГО МОЛОКА

Задание: Определить бродильный титр пастеризованного молока. Определить КМАФАнМ пастеризованного молока. Определить промышленную стерильность стерилизованного молока.

Микробиологический контроль пастеризованного молока

В питьевом молоке и сливках выборочно от одной - двух партий не реже одного раза в пять дней определяют общее количество бактерий и наличие БГКП.

Отбор проб. Пастеризованное молоко во флягах после тщательного перемешивания стерильной мутовкой отбирают черпаком в количестве 50-60

см³ в стерильную посуду с пробкой. Продукты, расфасованные в потребительскую тару, отбирают по одному - два образца от партии. Кончик пакета протирают ватой, смоченной спиртом, и отрезают ножницами, предварительно профламбированными в пламени спиртовки. При контроле молока из секции охлаждения пастеризатора обжигают пробный кран и наливают молоко в стерильную посуду с пробкой.

Контроль эффективности пастеризации. Эффективность пастеризации молока и сливок контролируют вне зависимости от качества готового продукта не реже одного раза в декаду. Для этого 10 см³ молока, отобранного после секции охлаждения, засевают в 50 см³ среды Кесслера. Бактерии группы кишечной палочки не должны обнаруживаться в указанном объеме молока, проба на фосфатазу должна быть отрицательной. Общее количество бактерий в 1 см³ молока, отобранного после секции охлаждения пастеризатора, не должно превышать 10 тыс.

Определение КМАФАнМ и БГКП. В отобранных пробах молока определяют КМАФАнМ. Для посева готовят разведения продукта от 10⁻¹ до 10⁻⁵ см³.

Для определения БГКП делают посев одного, двух и трех разведений продукта в среду Кесслера. Микробиологические показатели молока и сливок пастеризованных приведены в табл. 6

Таблица 6

Допустимые уровни содержания микроорганизмов
в молоке и сливках пастеризованных

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются		Примечание
		БГКП (колиформы)	патогенные, в том числе сальмонеллы	
<i>Молоко, сыворотка, пахта пастеризованные</i>				
В потребительской таре	1 · 10 ⁵	0,01	25	<i>S.aureus</i> в 1 см ³ не допускаются, <i>L.monocytogenes</i> в 25 см ³ не допускаются
Во флягах и цистернах	2 · 10 ⁵	0,01	25	<i>S.aureus</i> в 0,1 см ³ не допускаются, <i>L.monocytogenes</i> в 25 см ³ не допускаются
<i>Сливки пастеризованные</i>				
В потребительской таре	1 · 10 ⁵	0,01	25	<i>S. aureus</i> в 1 см ³ не допускаются, <i>L. monocytogenes</i> в 25 см ³ не допускаются

Во флягах и цистернах	$2 \cdot 10^5$	0,01	25	<i>S. aureus</i> в 0,1 см ³ не допускаются, <i>L. monocytogenes</i> в 25 см ³ не допускаются
Молоко топленое	$2,5 \cdot 10^3$	1,0	25	<i>S. aureus</i> не допускаются, <i>L. monocytogenes</i> в 25 см ³ не допускаются
Молоко и сливки стерилизованные	Требования промышленной стерильности: 1) после термостатной выдержки при температуре 37 °С в течение трех - пяти суток – отсутствие видимых дефектов и признаков порчи (вздутие упаковки, изменение внешнего вида и другие), отсутствие изменений вкуса и консистенции; 2) после термостатной выдержки допускаются изменения: а) титруемой кислотности – не более чем на 2 °Т; 3) КМАФАнМ – не более 10 КОЕ/см ³ (г)			

Микробиологический контроль стерилизованного молока

Для контроля, стерилизованного в потоке молока, отбирают для исследования по одному пакету через каждый час работы с каждого фасовочного автомата. Контроль готовой продукции осуществляют не реже двух раз в неделю. Отобранные образцы должны соответствовать требованиям промышленной стерильности.

Для определения промышленной стерильности отобранные упаковки со стерилизованным молоком выдерживают при температуре 37 °С в течение трех суток, а со сливками – в течение пяти суток. После термостатной выдержки проводят осмотр образцов продукта. При наличии вздутия упаковки или изменения внешнего вида молока в бутылках (наличия сгустка, отстоя сыворотки, наличия хлопьев молока и др.) упаковки считают не отвечающими требованиям промышленной стерильности. Упаковки без внешних дефектов вскрывают, стерилизованное молоко и сливки анализируют органолептически.

Продукт отвечает требованиям промышленной стерильности, если не установлено изменений консистенции и вкуса, кислотность молока увеличилась не более чем на 2 °Т, в микроскопическом препарате отсутствуют клетки бактерий, а общее количество микроорганизмов в 1 см³ не превышает 10.

Контрольные вопросы

1. Метод определения эффективности пастеризации.
2. Какие молоко и сливки называют питьевыми?
3. С какой целью охлаждают молоко?
4. Что такое пастеризация и стерилизация? Чем они отличаются?
5. Какие микроорганизмы выдерживают режимы пастеризации
6. Назовите пороки питьевого молока.

ТЕМА 7. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Задание: Сделать посеvy сметаны для определения броидильного титра и количества дрожжей и плесеней. Приготовить и просмотреть микроскопические препараты предложенных кисломолочных продуктов, зарисовать микроскопическую картину.

Микробиологический контроль кисломолочных напитков

Обор проб для исследования кисломолочных напитков производится так же, как и при исследовании пастеризованного молока: после розлива отбирают по одному - два образца в упаковке от партии.

Готовую продукцию контролируют на наличие бактерий группы кишечных палочек и по микроскопическому препарату не реже одного раза в пять дней.

Для определения наличия БГКП кисломолочные продукты предварительно нейтрализуют. Для этого отбирают стерильной пипеткой 10 см³ исследуемого продукта в стерильную колбочку и добавляют 1 см³ 10 %-го раствора двууглекислого натрия. Содержимое колбочки перемешивают и засевают в три пробирки со средой Кесслера по 1 см³ самого продукта, а также его первого и второго разведений. Для контроля состава микрофлоры готовых кисломолочных напитков просматривают микроскопические препараты, окрашенные метиленовым синим.

В поле зрения препарата, приготовленного из йогурта, ряженки, простокваши «Мечниковской», «Южной», «Болгарской», должны находиться цепочки кокков и длинные тонкие палочки; из ацидофильно-дрожжевого молока – ацидофильные палочки и дрожжи; из кефира – стрептококки, короткие палочки, изредка единичные дрожжевые клетки и т. д.

Микробиологические показатели кисломолочных напитков приведены в табл. 7.

Таблица 7

Допустимые уровни содержания микроорганизмов в кисломолочных напитках

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г	Масса продукта (г), в которой не допускаются			Дрожжи (Д), плесени (П), КОЕ/г, не более
		БГКП (коли- формы)	<i>S. aureus</i>	Патогенные, в том числе сальмонеллы	
Жидкие кисломолочные продукты, в том числе йогурт, со сроками годности не более 72 ч	МКБ не менее 1*10 ⁷	0,01	1,0	25	–
Жидкие кисломолочные продукты, в том числе йогурт, со сроками годности более 72 ч: без компонентов	МКБ не менее 1*10 ⁷	0,1	1,0	25	Д – 50*, П – 50

с компонентами	МКБ не менее $1 \cdot 10^7$	0,01	1,0	25	Д – 50*, П – 50
Жидкие кисломолочные продукты, обогащенные бифидобактериями, со сроками годности более 72 ч	МКБ не менее $1 \cdot 10^7$; бифидобактерии не менее $1 \cdot 10^6$	0,1	1,0	25	Д – 50*, П – 50
Ряженка	–	1,0	1,0	25	–
Сметана и продукты на ее основе	МКБ не менее $1 \cdot 10^7$	0,001***	1,0	25	Д – 50***, П – 50***
Термически обработанные сквашенные молочные и молочные составные продукты без и с компонентами**	–	1,0	1,0	25	Д – 50, П – 50

* Кроме напитков, изготавливаемых с использованием заквасок, содержащих дрожжи.

** Для термически обработанных продуктов – 0,01.

*** Для продуктов со сроками годности более 72 ч.

Микробиологический контроль сметаны

Отбор пробы производится в стерильную посуду после тщательного перемешивания из двух - трех мест партии при крупной расфасовке (фляги, бочки), а при мелкой расфасовке отбирают два образца от партии.

Сметану нейтрализуют добавлением 10 %-го раствора двууглекислого натрия до pH 6,5–6,8, а затем готовят десятикратные разведения продукта от 10^{-1} до 10^{-4} см³ для определения БГКП. С этой целью делают посев по 1 см³ указанных разведений сметаны в четыре пробирки со средой Кесслера. Бактерии группы кишечной палочки не должны обнаруживаться в 0,01–0,001 см³ продукта (см. табл. 7).

В сметане со сроком годности более 72 ч. определяют количество дрожжей и плесеней путем посева 1 г продукта и его первого разведения в чашки Петри с суслон-агаром или средой Сабуро.

При просмотре микроскопических препаратов сметаны в поле зрения должны находиться молочнокислые стрептококки (в препаратах бифидосметаны – дополнительно единичные клетки бифидобактерий). Наличие посторонних микроорганизмов (термоустойчивых молочнокислых палочек, дрожжей, молочной плесени) свидетельствует о низком санитарно-гигиеническом уровне производства.

Микробиологический контроль творога

При отборе творога из крупной тары (бочек, фляг) верхний слой продукта зачищают. Пробу отбирают стерильным щупом на расстоянии 3-5 см от края, направляя щуп к противоположной стороне и опуская примерно на 3/4 его длины. Из столбика творога на щупе отбирают стерильным шпателем 15–20 г творога и помещают в стерильную посуду, которую закрывают стерильной пробкой. От расфасованных продуктов отбирают один - два образца в упаковке.

Для микробиологического анализа отвешивают 10 г продукта на стерильном часовом стекле (или чашке Петри) и тщательно растирают его в стерильной или профламбированной ступке. К навеске добавляют 90 см³ стерильного физиологического раствора, подогретого до 40-45 °С, и получают разведение продукта 1:10, из которого готовят все последующие разведения.

Готовый творог анализируют на присутствие БГКП в определенной массе и просматривают микроскопический препарат. Бактерии группы кишечной палочки определяют посевом по 1 см³ разведений продукта от 10⁻¹ до 10⁻⁵ в пробирки со средой Кесслера. Пробирки с посевами выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 18–24 ч, после чего их просматривают и определяют бродильный титр по наличию газообразования в поплавках.

В микроскопическом препарате творога должны обнаруживаться молочнокислые стрептококки. Обнаруженные в препарате дрожжи, палочки, молочная плесень являются посторонними микроорганизмами.

Микробиологические показатели творога приведены в табл. 8.

Таблица 8

Допустимые уровни содержания микроорганизмов в твороге

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г	Масса продукта (г), в которой не допускаются			Дрожжи (Д), плесени (П), КОЕ/г, не бо- лее
		БГКП (коли- формы)	<i>S. aureus</i>	Патоген- ные, в том числе сальмонел- лы	
Творог и творожные изделия со сроками годности не более 72 ч	МКБ не менее 1*10 ⁶	0,001	0,1	25	–
Творог и творожные изделия со сроками годности более 72 ч, в том числе замороженные	–	0,01	0,1	25	Д – 100, П – 50
Творожные изделия термической обработки	–	0,1	1,0	25	Д + П – 50
Творог зерненный	–	0,01	0,1	25	Д – 100, П – 50

Контрольные вопросы

1. Чем обусловлены диетические и лечебные свойства кисломолочных продуктов?
2. Из каких источников микроорганизмы могут попадать в кисломолочные продукты?
3. Как классифицируют кисломолочные продукты в зависимости от используемых для их производства микроорганизмов?

4. Какие микроорганизмы входят в состав закваски для кефира и кумыса?
5. Из каких видов микроорганизмов состоят закваски для творога, сметаны, простокваши, йогурта, варенца, ряженки?
6. Назовите пороки кисломолочных продуктов.
7. Как контролируют производство кисломолочных продуктов?

ТЕМА 8. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЛИВОЧНОГО МАСЛА

Задание: Расплавить сливочное масло на водяной бане и приготовить разведения от 10^{-1} до 10^{-5} . Для определения КМАФАнМ засеять в чашки Петри по 1 см^3 10^{-2} , 10^{-3} и 10^{-4} разведений масла и залить чашки расплавленным и остуженным до температуры $45 \text{ }^\circ\text{C}$ МПА. Для определения количества дрожжей и плесеней засеять в чашки Петри первое и второе разведения масла и залить чашки сушлом-агаром. Для определения количества протеолитических бактерий засеять в чашки первое и второе разведения масла и залить чашки молочным агаром. Для определения БГКП засеять 1 см^3 продукта и его первое и второе разведения в пробирки со средой Кесслера.

Отбор пробы масла. Образец масла в транспортной таре отбирают стерильным щупом, предварительно сняв верхний слой, на расстоянии 3–5 см от края, направляя щуп к противоположной стороне и опуская на $3/4$ его длины. Из столбика масла на щупе отбирают стерильным шпателем 15–20 г масла и помещают в стерильную посуду. Оставшийся после отбора пробы столбик масла на щупе возвращают на прежнее место, а поверхность масла аккуратно заделывают.

От партии масла в потребительской таре отбирают для анализа стерильным шпателем 15–20 г, включая поверхностный слой. Отобранную пробу помещают в стерильную посуду, которую закрывают стерильной пробкой.

Подготовка пробы к анализу. Перед исследованием пробу масла расплавляют на водяной бане при температуре $40\text{--}45 \text{ }^\circ\text{C}$ и перемешивают для получения однородной эмульсии. Из полученной эмульсии стерильной пипеткой берут 1 см^3 и вносят в пробирку с 9 см^3 стерильного физиологического раствора, подогретого до $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Из полученного таким образом первого разведения, готовят второе разведение.

В кисломолочном масле два раза в месяц определяют наличие БГКП, патогенных бактерий, протеолитических бактерий, дрожжей и плесеней, а в сладкомолочном, кроме того, общее количество микроорганизмов (КМАФАнМ). При необходимости определяют количество липолитических бактерий.

Бродильный титр определяют посевом 1 см^3 продукта и его 10^{-1} и 10^{-2} разведений в пробирки со средой Кесслера.

Количество протеолитических бактерий определяют посевом на молочный агар по 1 см^3 разведений от 10^{-1} до 10^{-4} для сладкомолочного масла и от 10^{-1} до 10^{-3} для кисломолочного масла. Чашки с посевами помещают в термостат при температуре $(30 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ и инкубируют в течение 24 ч. Протеолитические бактерии учитывают по зонам просветления вокруг колоний, которые образуются в результате разложения белка этими микроорганизмами.

Количество дрожжей и плесеней определяют посевом в чашки Петри от 10^{-1} до 10^{-2} разведений масла, которые затем заливают суслон-агаром.

Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в сладкосливочном масле определяют посевом в чашки Петри с МПА 10^{-2} – 10^{-4} разведений сливочного масла, кроме кисломасляного.

Таблица 9

Допустимые уровни содержания микроорганизмов в масле

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются			Дрожжи, КОЕ/г, не более	Плесени, КОЕ/г, не более	Примечание
		БГКП (коли- формы)	<i>S. aureus</i>	патоген- ные, в том числе сальмо- неллы			
Масло сладкосливочное, кисломасляное, соленое, несоленое, в том числе: без компонентов с компонентами	$1 \cdot 10^{5*}$	0,01	0,1	25	100 в сумме		
	$1 \cdot 10^5$	0,01	0,1	25	100	100	
Паста масляная (м.д.ж. 30-59 %), в том числе: без компонентов с компонентами	$2 \cdot 10^5$	0,01	0,1	25	100	100	
	$2 \cdot 10^5$	0,001	0,1	25	100	100	
Масло топленое	$1 \cdot 10^3$	1,0	–	25	–	200	
Сливочно-растительный спред	$1 \cdot 10^5$	0,01	0,1	25	100	100	

*КМАФАнМ в кисломасляном масле не нормируется.

Контрольные вопросы

1. Микроорганизмы, обнаруживаемые в кисло- и сладкосливочном масле в различные периоды хранения.
2. Отбор и подготовка к исследованию проб масла.
3. Подготовка к микроскопированию мазков масла.
4. Микробиологические нормы оценки масла.
5. Определение Coli - титра кисло- и сладкосливочного масла.
6. Какова роль микроорганизмов при производстве сладкосливочного и кисломасляного масла?
7. Назовите источники поступления микроорганизмов в масло.
8. Какие виды микроорганизмов вводят в состав закваски для кисломасляного масла?
9. От чего зависит запах масла?
10. Как изменяется микрофлора кисло- и сладкосливочного масла при различных температурах хранения?
11. Какие пороки масла могут возникнуть при развитии микроорганизмов?

12. При помощи, каких факторов можно повысить стойкость масла при хранении?
13. Назовите пороки масла.
14. По каким показателям определяют качество масла?

ТЕМА 9. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ В СЫРОДЕЛИИ

Задание: Определить качество сырого молока по сычужно-бродильной пробе. Приготовить навеску сыра и его разведения. В пробе исследуемого сыра определить бродильный титр, количество маслянокислых бактерий, дрожжей и плесеней.

При контроле процесса производства сыра исследуют сырое молоко, предназначенное для выработки сыра, закваску, сычужный фермент, пастеризованное молоко и сыр.

В сыром молоке, поступающем на сыродельные заводы, кроме редуктазной пробы и наличия ингибирующих веществ, один раз в 10 дней определяют общее число спор мезофильных анаэробных лактатсбраживающих бактерий и сычужно-бродильную пробу.

В пастеризованной смеси молока из сырной ванны или сыроизготовителя не реже одного раза в 10 дней определяют общее число спор мезофильных анаэробных лактатсбраживающих бактерий и БГКП. Споры указанных бактерий не должны обнаруживаться в 0,1 см³; БГКП должны отсутствовать в 3 см³ молока.

Исследование качества сырого молока, используемого для производства сыра

Сычужно-бродильная проба. Метод основан на способности некоторых микроорганизмов свертывать молоко в присутствии сычужного фермента. По характеру образовавшегося сгустка оценивают качество молока на его пригодность для изготовления сыра.

Чисто вымытые и высушенные широкие пробирки ополаскивают исследуемым молоком и наливают в них около 30 см³ молока, затем в каждую пробирку вносят по 1 см³ раствора сычужного фермента, хорошо перемешивают и ставят на 12 ч в термостат при температуре (38 ± 1) °С. По истечении 12 ч пробы осматривают и относят молоко к одному из трех классов (табл. 10).

Таблица 10

Оценка качества молока по сычужно-бродильной пробе

Класс	Оценка качества молока	Характеристика сгустка
I	Хорошее	Сгусток с гладкой поверхностью, упругий на ощупь, без глазков на продольном разрезе, плавает в прозрачной сыворотке, которая не тянется и не горькая на вкус
II	Удовлетворительное	Сгусток мягкий на ощупь, с единичными глазками (1–10), разорван, но не вспучен
III	Плохое	Сгусток с многочисленными глазками, губчатый, мягкий на ощупь, вспучен, всплыл кверху или вместо сгустка образуется хлопьевидная масса

Для производства сыра не допускается сырое молоко III класса по редуктазной пробе и III класса по сычужно-бродильной пробе.

Определение количества спор мезофильных лактатсбраживающих анаэробных бактерий.

Готовят различные разведения сырого молока (или сыра), прогревают их при температуре $(75 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 30 мин и высевают по 1 см^3 каждого из разведений, как минимум, в две пробирки со средой СДА (среда для анаэробов). После застывания питательной среды ее поверхность заливают слоем водного агара высотой 15–20 мм. Посевы выдерживают в термостате при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение трех суток. Рост мезофильных анаэробных спорообразующих бактерий в посевах определяют по образованию разрывов столбика агара и изменению цвета питательной среды с красного на соломенно-желтый. Образование в среде желтых пятен или точек также указывает на наличие лактатсбраживающих анаэробных бактерий.

Микробиологический анализ готового сыра

Отбор проб. Поверхность сыра в месте взятия пробы протирают ватой, смоченной этиловым спиртом, спирт зажигают. Стерильный щуп вводят наклонно в середину головки на $3/4$ его длины. Из столбика сыра на щупе отбирают стерильным шпателем 15–20 г сыра и помещают в стерильную посуду с пробкой. Верхнюю часть столбика сыра на щупе возвращают на прежнее место, поверхность сыра заливают парафином или оплавливают нагретой металлической пластинкой.

Подготовка проб к анализу. Из взятого образца отвешивают 10 г на стерильном часовом стекле (чашке Петри, бюксе), переносят в стерильную или профламбированную ступку и тщательно растирают с небольшим количеством стерильной воды, добавляя стерильную воду, подогретую до $40\text{--}45^\circ\text{C}$ с таким расчетом, чтобы общий объем жидкости составил 90 см^3 .

Содержимое ступки перемешивают и дополнительно растирают в течение 3–5 мин до получения тонкой суспензии. Суспензию (разведение сыра 10^{-1}) переносят в колбу и закрывают стерильной пробкой. Из первого разведения готовят все последующие разведения, тщательно перемешивая суспензию.

В сыре один раз в декаду после прессования, а также в процессе созревания определяют бродильный титр, количество маслянокислых бактерий и дрожжей.

Для определения бродильного титра готовят разведения сыра от 10^{-1} до 10^{-4} и засевают их по 1 см^3 в пробирки со средой Кесслера.

Для определения количества маслянокислых бактерий засевают по 1 см^3 первого, второго и третьего разведений сыра в пробирки с расплавленной средой СДА. После инкубации в течение 36–48 ч при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ подсчитывают количество выросших в пробирках колоний.

Для определения количества дрожжей и плесеней делают посев по 1 см^3 разведений сыра от 10^{-1} до 10^{-4} в чашки Петри с суслом-агаром.

Бактерии группы кишечных палочек должны отсутствовать в 0,001 г доб-

рокачественного сыра, содержание спор маслянокислых бактерий не должно превышать 100 в 1 г сыра (табл. 11.)

Таблица 11

Допустимые уровни содержания микроорганизмов в сыре

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются		Примечание
		БГКП (колиформы)	патогенные, в том числе сальмонеллы	
Сыры (сверхтвердые, твердые, полутвердые, мягкие, сывороточно-альбуминные)	–	0,001	25	<i>S. aureus</i> не допускаются в 0,001 г; <i>L. monocytogenes</i> не допускаются в 25 г
Сыры и сырные продукты плавленые, в том числе:				
без компонентов	$5 \cdot 10^3$	0,1	25	плесени – не более 50, дрожжи – не более 50
с компонентами	$1 \cdot 10^4$	0,1	25	плесени – не более 100, дрожжи – не более 100
копченые	$1 \cdot 10^4$	0,1	25	плесени – не более 100, дрожжи – не более 100

Контрольные вопросы

1. Цель и порядок постановки пробы на брожение. Сычужно-бродильная проба и оценка молока по классам.
2. Отбор проб сыра, приготовление мазков и подготовка материала к посеву.
3. Закваски, используемые при приготовлении разных типов сыра.
4. Роль пропионовокислых бактерий в твердых сырах.
5. Приготовление заквасок пропионовокислых бактерий.
6. Плесневые грибы, используемые в сыроделии. Их назначение в созревании сыра.
7. Из каких источников микроорганизмы попадают в сыр?
8. Какие факторы характеризуют сыропригодность молока?
9. Как устанавливают сыропригодность молока? Как исправляют не сыро пригодное молоко?
10. С какой целью при выработке сыров молоко подвергают предварительному созреванию?
11. Какие закваски применяют в производстве крупных и мелких сыров?
12. Плесени каких видов используют при производстве мягких сыров?
13. Какие микроорганизмы входят в состав слизи твердых сыров?
14. Как изменяется микрофлора твердых крупных и мелких сыров в процессе созревания сыра?

15. Каким превращениям подвергаются молочный сахар, белки и жиры при созревании сыра?

16. Развитие, каких микроорганизмов обуславливает образование рисунка в мелких и крупных твердых сырах?

17. Какими способами можно ускорить процесс созревания сыров?

18. Назовите пороки консистенции, рисунка, вкуса, запаха, цвета и внешнего вида сыров.

ТЕМА 10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ, ЗАКВАСКАХ, БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТАХ

Задание: Приготовить десятикратные разведения кисломолочного напитка, творога или бактериального препарата. Посеять соответствующие разведения исследуемого продукта в чашки Петри с агаризованной питательной средой. Выдержать чашки с посевами в термостате при оптимальной температуре в течение 48 ч. Подсчитать число выросших на чашках колоний молочнокислых бактерий и определить их количество в 1 см³ кисломолочного напитка.

Определение молочнокислых бактерий в ферментированных молочных продуктах проводится в соответствии с ГОСТ 33951-2016, который распространяется на пищевые и кисломолочные продукты, закваски и бактериальные препараты молочнокислых микроорганизмов.

Отбор проб и подготовку их к анализу осуществляют в соответствии с ГОСТ.

Ход анализа. Для определения присутствия и подсчета количества молочнокислых бактерий в кисломолочных напитках отобранную для анализа упаковку протирают спиртом, надрезают ее край профламбированными ножницами и отбирают стерильной пипеткой 1 см³ продукта.

Для определения молочнокислых бактерий в твороге или сыре взвешивают с соблюдением правил стерильности 10 г продукта, переносят навеску в стерильную ступку и растирают, порциями добавляя жидкость из колбы, содержащей 90 см³ стерильного физиологического раствора. Приготовленную суспензию переносят обратно в колбу и получают исходное разведение продукта 10⁻¹.

Для приготовления разведений сухих заквасок или бактериальных препаратов края флакона или пакета протирают спиртом, край флакона обжигают и вынимают пробку, а пакет надрезают профламбированными ножницами. Отвешивают 1 г испытываемого материала в стерильную или профламбированную ступку, прикрытую стерильной крышкой от чашки Петри, тщательно растирают, добавляя небольшое количество стерильного физиологического раствора или фосфатного буфера из колбы, содержащей 99 см³ раствора или буфера. Суспензированный материал переливают в колбу с оставшимся раствором и таким образом получают разведение сухой закваски или бактериального препарата 10⁻².

Из продуктов или их исходных разведений готовят следующие десятикратные разведения в соответствии с допустимым количеством микроорганизмов, указанным в нормативно-технической документации.

В табл. 12 приведены разведения молочных продуктов для посева на питательные среды.

Таблица 12

Разведения молочных продуктов для определения в них количества молочнокислых бактерий

Наименование продукта	Разведения, используемые для посева
Кисломолочные напитки, закваски жидкие и сухие, творог, сметана, сыры	10^{-6} ; 10^{-7} ; 10^{-8} ; 10^{-9}
Бактериальные препараты молочнокислых бактерий	10^{-9} ; 10^{-10} ; 10^{-11}
Сухие кисломолочные продукты	10^{-6} ; 10^{-7} ; 10^{-8}

Для посева в агаризованную среду отбирают те разведения продукта, при посеве которых на чашках Петри вырастает от 15 до 150 колоний.

Для учета молочнокислых бактерий в ферментированных молочных продуктах, заквасках и бактериальных препаратах чашечным методом в качестве питательной среды используют агар с гидролизированным молоком.

Подсчет выросших колоний молочнокислых бактерий на чашках Петри и пересчет их содержания в 1 г или 1 см³ продукта проводят таким же образом, как и при определении КМАФАнМ.

Контрольные вопросы

1. Что такое производственные штаммы молочнокислых бактерий?
2. Что такое гомоферментативное молочнокислое брожение?
3. При изготовлении каких кисломолочных продуктов используют этот тип брожения?
4. Каких возбудителей и конечные продукты гомоферментативного брожения вы знаете?
5. Что такое гетероферментативное брожение?
6. При изготовлении каких кисломолочных продуктов используют этот тип брожения?
7. Что такое бифидоброжение? Каких возбудителей брожения вы знаете?

ТЕМА 11. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА БИФИДОБАКТЕРИЙ В КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ

Задание: Приготовить фиксированные окрашенные препараты бифидо-содержащих кисломолочных продуктов. Найти в препарате бифидобактерии. Провести анализ по определению содержания бифидобактерий в исследуемом продукте.

Отбор проб. Для анализа отбирают три единицы потребительской упаковки методом случайной выборки. Микробиологический анализ продукта проводят не более чем через 4 ч с момента отбора проб. Пробы надо хранить и транспортировать при температуре продукта не выше 6 °С, не допуская подмораживание.

Подготовка проб к анализу. Перед вскрытием поверхность упаковки обмывают, протирают, затем обрабатывают 70 %-м этиловым спиртом. Вскрытие упаковки производят в асептических условиях. Каждую отобранную упаковку анализируют отдельно.

Из каждой упаковки после тщательного перемешивания отбирают в стерильную колбу 10 см³ исследуемого продукта и добавляют 1,0 см³ стерильного раствора бикарбоната натрия с массовой концентрацией 100 г/дм³. Содержимое колбы перемешивают.

К нейтрализованному образцу продукта добавляют физиологический раствор до достижения общего объема пробы 100 см³, после чего смесь опять тщательно перемешивают. Таким образом, получают разведение продукта 10⁻¹. Пипетку, которой отбирали пробу продукта, промывают до 10 раз полученной смесью до верхнего уровня имеющихся на ней делений.

Из полученного первого разведения готовят последующие, используя новую стерильную пипетку для каждого разведения. Для посева используют разведения 10⁻⁵; 10⁻⁶; 10⁻⁷; 10⁻⁸.

Проведение исследования. Готовят два ряда питательных сред, каждый по пять пробирок, содержащих среду Блаурока; кукурузно-лактозную – КЛС или гидролизатно-молочную – ГМС.

Перед употреблением среду следует нагреть на кипящей водяной бане для удаления, содержащегося в ней растворенного кислорода. При использовании плотных питательных сред их следует разогреть до полного расплавления агара и затем остудить до температуры (40 ± 2) °С.

Внесение посевного материала в среду осуществляют с последнего разведения, внося в две последние пробирки по 1 см³ разведения 10⁻⁸. Для каждого посева используют новую стерильную пипетку. Пробирки с посевами разведения продукта выдерживают в термостате с температурой (37 ± 1) °С в течение 72 ч, просматривая посева через 24 и 48 ч.

По окончании инкубации учитывают последние пробирки, в которых выросли колонии, типичные для бифидобактерий: в виде «гвоздиков», «вытянутых веретен», иногда в виде «полос», расположенных вдоль пробирки. В плотных средах колонии бифидобактерий выглядят в виде «дисков» или «гречишных зерен». Выросшие колонии подсчитывают.

Подтверждение наличия бифидобактерий устанавливают путем микроскопирования колоний. Препараты из колоний окрашивают по Граму. Бифидобактерии грамположительны и имеют под микроскопом вид тонких, мелкозернистых, слегка изогнутых палочек с раздвоением на концах (бифуркацией) или без него; располагаются группами, скоплениями в виде китайских иероглифов, могут образовывать короткие цепочки.

Содержание живых бифидобактерий в 1 см³ продукта определяют по формуле:

$$X = a \cdot 10^n,$$

где, X – количество клеток живых бифидобактерий в 1 см³ продукта; a – среднее количество колоний в последнем, засеянном в двух рядах разведении продукта; n – показатель последнего разведения продукта, в котором отмечен рост бифидобактерий.

Контрольные вопросы

1. Как осуществляют контроль качества заквасок и кисломолочных продуктов?
2. На какие группы делятся продукты с использованием бифидобактерий?
3. На какие группы делятся кисломолочные продукты в зависимости от состава их микрофлоры?
4. Какие пороки кисломолочных продуктов Вы знаете?

ТЕМА 12. МИКРООРГАНИЗМЫ – ВОЗБУДИТЕЛИ ПОРЧИ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Задание: Приготовить фиксированные окрашенные препараты гнилостных бактерий, энтерококков, маслянокислых бактерий и зарисовать микроскопическую картину. Приготовить фиксированные окрашенные препараты кисломолочных продуктов и рассмотреть в них присутствие термоустойчивых молочнокислых палочек. Рассмотреть колонии мицелиальных грибов, выросших на молочных продуктах.

Основными возбудителями порчи молочных продуктов являются гнилостные бактерии, энтерококки, термоустойчивые молочно-кислые палочки, маслянокислые бактерии.

Гнилостные бактерии под действием протеаз вызывают гидролиз белков молока с накоплением органических кислот, альдегидов, кетонов, аминов, аммиака, сероводорода, диоксида углерода. Развитие гнилостных бактерий в молочных продуктах приводит к появлению горького вкуса, неприятного запаха. Некоторые из продуктов распада белка ядовиты и могут вызвать пищевое отравление. *Энтерококки* – молочнокислые стрептококки кишечного проис-

хождения, выделяются во внешнюю среду в довольно значительных количествах и контаминируют пищевые продукты. Они также обладают активными протеазами и способны выделять фермент типа сычужного, вызывающий свертывание молока без нарастания кислотности. Основным видом порчи, вызываемой термоустойчивыми *молочнокислыми палочками*, является излишняя кислотность. *Маслянокислые бактерии* сбраживают лактозу и лактаты с накоплением масляной кислоты, придающей продукту прогорклый вкус, и газов, что вызывает вспучивание, например, позднее вспучивание сыров.

Гнилостные бактерии. По морфологическим и физиологическим признакам гнилостные бактерии принято делить на четыре группы: спорообразующие и неспорообразующие аэробы, спорообразующие анаэробы, неспорообразующие аэробы и факультативные анаэробы (табл. 13).

Споры бактерий рода *Bacillus* обладают высокой термоустойчивостью и выдерживают пастеризацию и в некоторых случаях стерилизацию молока. Вследствие высокой активности протеолитических и липолитических ферментов эти бактерии вызывают гидролиз белков и жиров с появлением в продукте горького и прогорклого, вкуса. Развитие *B. cereus* и *B. mycoides* приводит к «сладкому» свертыванию (при низкой кислотности) сливок, сгущенного стерилизованного молока.

Таблица 13

Некоторые представители гнилостных бактерий

Аэробные спорообразующие грамположительные палочки	Аэробные неспорообразующие грамотрицательные палочки	Факультативно-анаэробные неспорообразующие грамотрицательные палочки	Облигатно-анаэробные спорообразующие грамположительные палочки
Род <i>Bacillus</i> : <i>B. subtilis</i> , <i>B. megatherium</i> , <i>B. mycoides</i> , <i>B. cereus</i>	Род <i>Pseudomonas</i> Род <i>Flavobacterium</i> Род <i>Alcaligenes</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i>	Род <i>Clostridium</i> : <i>C. putrificum</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. sporogene</i>

Аэробные спорообразующие бактерии. К типичным гнилостным аэробным палочкам, образующим эндоспоры, относятся *Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus mycoides*, *B. circulans*, *B. licheniformis*.

B. cereus. Все эти виды обладают высокой протеолитической активностью: разжижают желатин, свертывают и пептонизируют молоко, выделяют аммиак.

Bacillus subtilis (сенная палочка) (рис. 9) – прямые палочки с закругленными концами, иногда располагаются короткими цепочками, окраска по Граму положительная, в молодых культурах подвижны (перитрихи). Размеры клеток (0,6–0,7) (3–5) мкм. Образует эндоспоры, располагающиеся центрально, причем

диаметр спор превышает диаметр клетки. Колонии на мясопептонном агаре (МПА) серо-белого цвета, сухие, бугристые. При росте в мясопептонном бульоне (МПБ) на поверхности образуется сухая морщинистая пленка, бульон сначала мутнеет, а затем становится прозрачным. Оптимальная температура роста составляет 37 °С, температурный диапазон – от 5 до 55 °С.

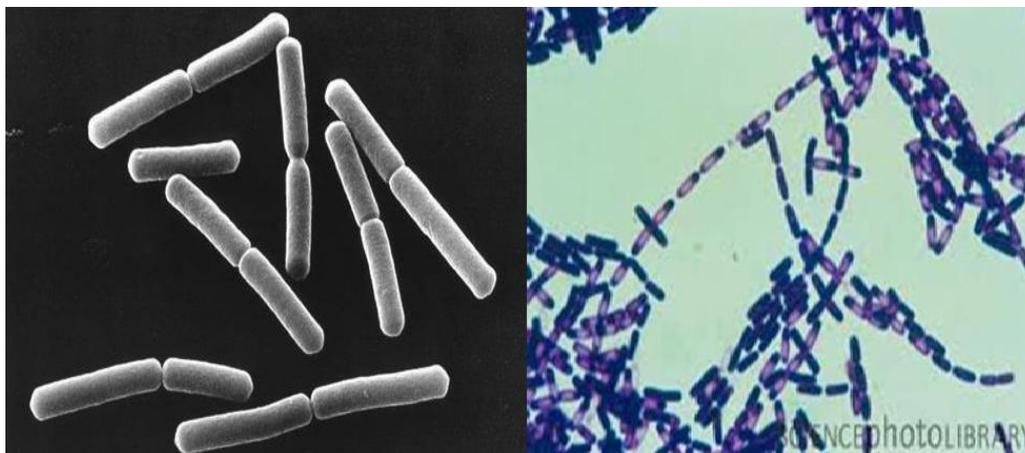


Рис. 9. Сенная палочка *Bacillus subtilis*

Bacillus megatherium (рис. 10) – крупная палочка размером (1,5–2,0) (3,5–7) мкм; грамположительная; подвижная; располагается чаще всего цепочками; образует споры, располагающиеся в центре клетки; капсул не формирует.

На поверхности МПА колонии *Bacillus megatherium* крупные, серо-белого цвета, гладкие, блестящие, с волокнисто-бахромчатыми краями. В мясопептонном бульоне вызывает помутнение. При расщеплении белков кроме аммиака образует сероводород.

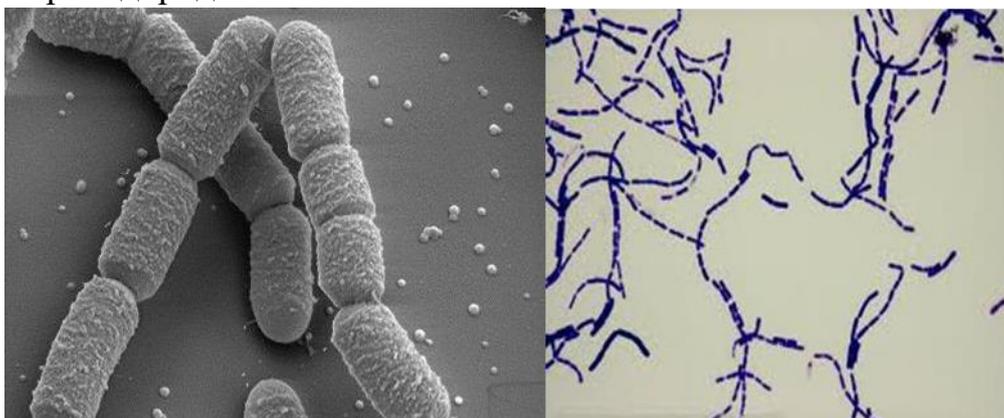


Рис. 10. *Bacillus megatherium*

Bacillus mycoides (грибовидная палочка) (рис. 11) – грамположительная, подвижная палочка (перитрих) размером (0,7–0,8) (1,2–6) мкм, образует споры овальной формы. На МПА рост колоний напоминает мицелий, откуда и название *mycoides*, что означает грибовидный. В МПБ образует пленку и плотный осадок, при этом бульон остается прозрачным. Оптимальная температура роста составляет 30–32 °С, температурный диапазон роста 10–45 °С.

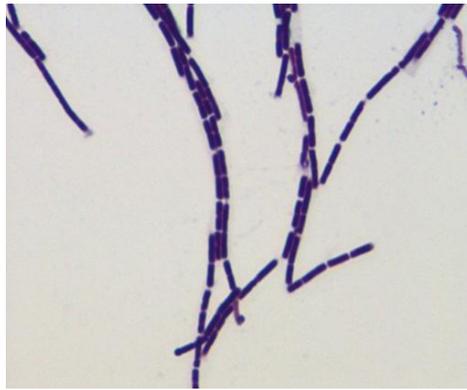


Рис. 11. Грибовидная палочка *Bacillus mycoides*

Bacillus cereus (рис. 12) – крупная грамположительная палочка длиной 8 мкм и диаметром 0,9–1,5 мкм, подвижная, образует эндоспоры, может формировать капсулу. По отношению к кислороду воздуха является микроаэрофилом. Оптимальная температура роста составляет 30–32 °С, температурный диапазон роста – от 10 до 48 С. Поверхностные колонии на МПА крупные, плоские, с изрезанными краями, иногда розово-коричневые за счет образования пигмента. Рост культуры в мясопептонном бульоне характеризуется наличием тонкой белой пленки, пристеночного кольца и образованием хлопьевидного осадка. На кровяном агаре вокруг колоний палочки цереус наблюдаются четко очерченные зоны гемолиза.

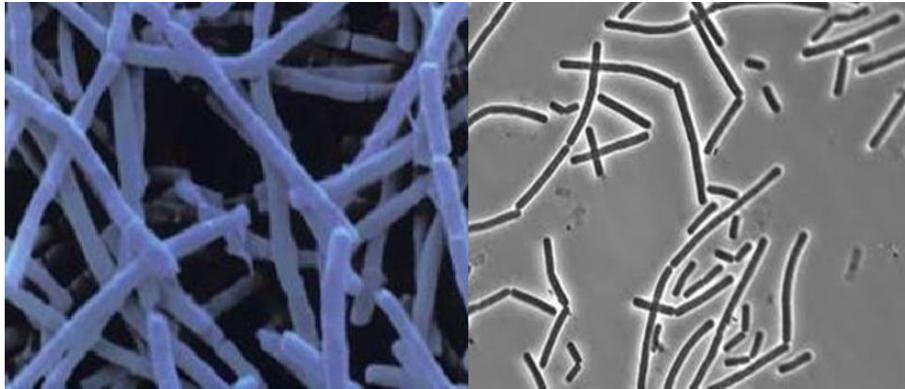


Рис. 12. *Bacillus cereus*

Споры палочки цереус выдерживают нагревание при температуре 105–125 °С в течение 10 мин. Вегетативные клетки устойчивы к высушиванию, а также высоким концентрациям хлорида натрия (до 10–15 %) и сахара (до 30–60 %). Все штаммы палочки цереус способны размножаться при щелочных значениях рН 9,0–9,5.

Кислая среда (рН 4,5–5,0) неблагоприятна для размножения данной палочки; наиболее чувствительна она и к уксусной кислоте.

Аэробные неспорообразующие бактерии. К этой группе относятся бактерии родов *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*

Род *Pseudomonas*. Бактерии рода *Pseudomonas* (рис. 13) – прямые или слегка изогнутые палочки размером (0,5–1,0) (1,5–5,0) мкм, грамотрицательные, подвижные за счет одного или нескольких полярных жгутиков; спор и капсул не образуют; аэробы, оксидазо- и каталазоположительные. Оптимальная температура роста составляет 18–22 °С, температурный диапазон роста 4–41 °С. Колонии на плотной среде блестящие, с ровными краями, часто окрашенные благодаря наличию пигментов: желто-зеленые у *P. fluorescens*, синевато-зеленые у *Pseudomonas aeruginosa*, желто-оранжевые у *P. alkaligenes*. Имеются и нефлюоресцирующие виды, например *P. fragi*. Типовой вид – *Pseudomonas aeruginosa*.

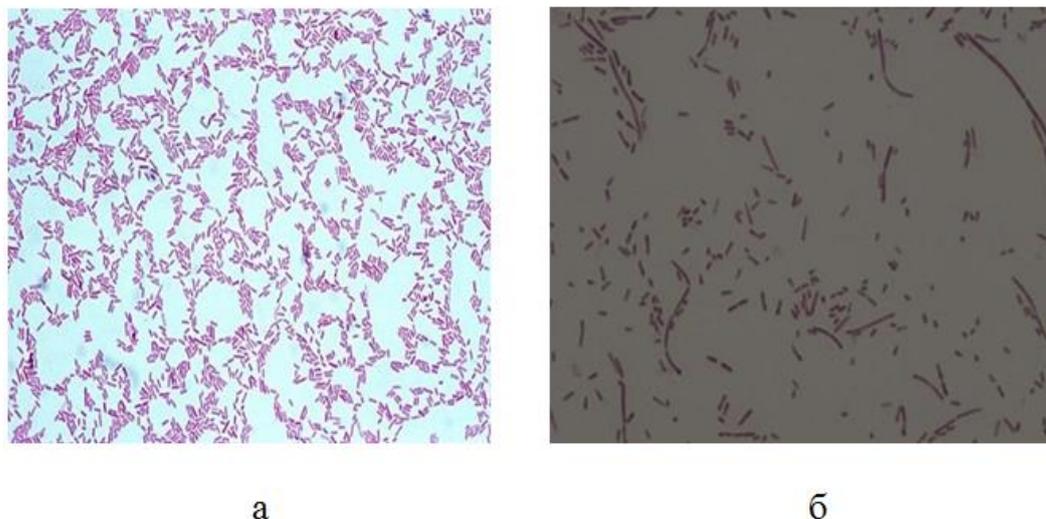


Рис. 13. Бактерии рода *Pseudomonas*

Псевдомонады являются доминирующими представителями психротрофных бактерий сырого молока. Наиболее часто встречаются *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. fragi*, *P. aeruginosa*. Многие виды псевдомонад продуцируют термостойкие липазы и протеазы, которые выдерживают пастеризацию молока и, несмотря на гибель вегетативных клеток, вызывают порчу молочных продуктов в процессе их хранения.

Род *Flavobacterium* – палочки с закругленными концами размером 0,5 (1,0–3,0) мкм, грамотрицательные, неподвижные, эндоспор не образуют. Оптимальная температура роста 25–30 °С. Колонии на плотных средах обычно окрашены в цвета от желтого до оранжевого, но есть и непигментированные штаммы. Каталазо-, фосфатазо- и оксидазоположительные. По типу питания – хемоорганотрофы. Типовой вид – *Flavobacterium aquatile*.

Флавобактерии широко распространены в почве, воде; они часто выделяются из охлажденных пищевых продуктов: молока, мяса, рыбы. Флавобактерии обладают активными липазами и вызывают порчу сливочного масла, сыров, консервированных молочных продуктов.

Род *Alcaligenes* – палочки или кокки размером (0,5–1,0) × (0,5–2,6)

мкм, располагающиеся одиночно; грамотрицательные, подвижные за счет перитрихально расположенных жгутиков; спор и других покоящихся форм не образуют. Оптимальная температура роста составляет 20–37 °С. Колонии на плотных средах неокрашенные. Род *Alcaligenes* включает 14 видов и 7 подвидов. Типовой вид – *Alcaligenes faecalis*.

Представители рода *Alcaligenes* вызывают появление посторонних запахов в молоке за счет расщепления белков, жиров и прогоркание сливочного масла.

Факультативно-анаэробные неспорообразующие бактерии. К этой группе бактерий относятся некоторые представители семейства *Enterobacteriaceae* (роды *Escherichia*, *Proteus*, *Serratia*) и рода *Aeromonas*.

Escherichia coli (кишечная палочка) (рис. 14). Мелкие палочки размером (1,0–1,5) (2–3) мкм, одиночные или в парах, грамотрицательные, подвижные (перитрихи); спор и капсул не образуют, каталазоположительные, оксидазоотрицательные. Оптимальная температура роста составляет 37–39 °С. На МПА образует бесцветные, блестящие, слегка слизистые колонии с гладкой поверхностью и ровными краями.

Кишечная палочка обладает слабой протеолитической активностью. Она не гидролизует молекулы казеина и свою ферментативную активность проявляет лишь на стадии расщепления пептонов.



Рис. 14. *Escherichia coli*

Proteus vulgaris (палочка протей) (рис. 15). Прямые палочки размером (0,4–0,8) (1,2–3,0) мкм, грамотрицательные, подвижные (перитрихи). Клетки имеют многочисленные фимбрии. Спор, капсул и пигментов не образуют. Представители рода *Proteus* легко идентифицируются благодаря своей способности к роению. При посеве в конденсационную воду свежеприготовленного мясопептонного агара через несколько часов наблюдается роение микроба, ползучий рост. Поверхность МПА покрывается тонкой вуалеобразной полупрозрачной пленкой. Оптимальная температура роста составляет 37 °С, благоприятное значение рН – нейтральное. Палочка протей при расщеплении белков образует сероводород, индол.

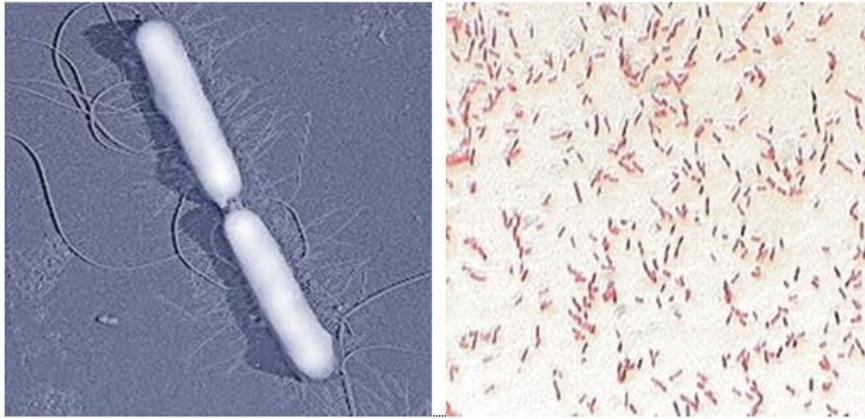


Рис. 15. *Proteus vulgaris* (палочка протей)

Serratia marcescens (рис. 16) – прямые палочки размером (0,5–0,8) (0,9–2,0) мкм, подвижные, грамотрицательные. При определенных условиях способны образовывать капсулу. Образует пигмент ярко-красного цвета – продиггизин, за счет чего на МПА вырастают мелкие круглые блестящие колонии ярко-красного цвета, похожие на капли крови, откуда вид получил название «чудесная палочка». Оптимальная температура роста составляет 22–25 °С, рН 6,5. Расщепляет белки с образованием сероводорода, аммиака, индола.

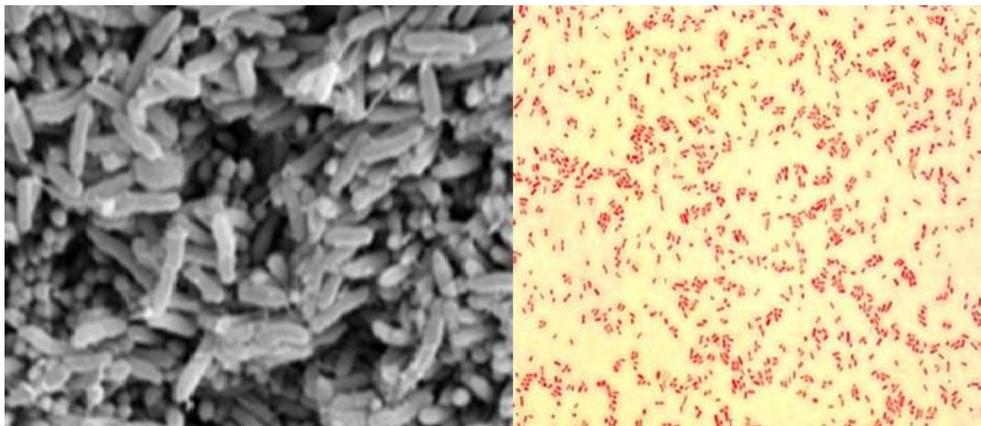


Рис. 16. *Serratia marcescens* («чудесная палочка»)

Род *Aeromonas*. Клетки имеют вид мелких палочек с закругленными концами размером (0,3–1,0) (1,0–3,5) мкм. Располагаются одиночно, парами или короткими цепочками. По Грамму окрашиваются отрицательно, подвижные за счет одного полярного жгутика. Оптимальный диапазон температуры роста составляет 22–28 °С. Оксидазо- и каталазоположительные. Типовой вид – *Aeromonas hydrophila* (рис. 17).

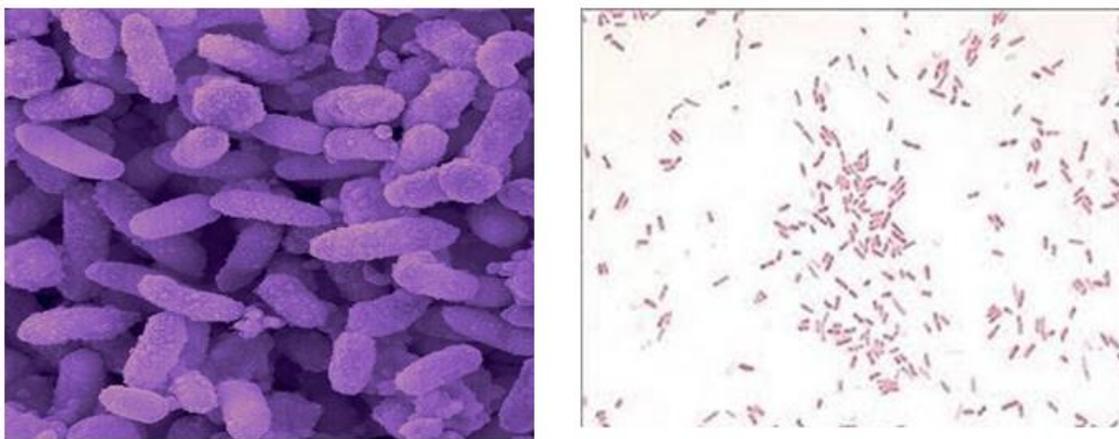


Рис. 17. *Aeromonas hydrophila*

Анаэробные спорообразующие палочки. *Clostridium putrificus* – длинные палочки размером (0,4–0,7) (7–9) мкм, располагаются одиночно или цепочками, грамположительные, подвижные (перитрихи). Образуют эндоспоры, которые смещены от центра, их диаметр превышает диаметр клетки. Каталазоотрицательные. Штаммы этого вида обладают сильно выраженной протеолитической активностью: разжижают желатин и кровяную сыворотку, свертывают и пептонизируют молоко. При расщеплении белка данная палочка образует сероводород, аммиак, индол. На кровяном агаре вокруг колоний наблюдаются зоны гемолиза. Этот вид является одним из наиболее распространенных возбудителей анаэробного разложения белков.

Clostridium sporogenes (рис. 18) – палочки размером (0,6–0,9) (3–7) мкм с закругленными концами, грамположительные, подвижные; быстро образуют эндоспоры, обладающие высокой термоустойчивостью (сохраняют жизнеспособность после выдержки в автоклаве при 120 °С в течение 20 мин). Оптимальная температура роста составляет 37 °С, но может расти и при 50 °С. Наиболее распространенный вид порчи – образование большого количества газа при расщеплении белков, что может привести к раздуванию упаковки, бомбажу консервов.

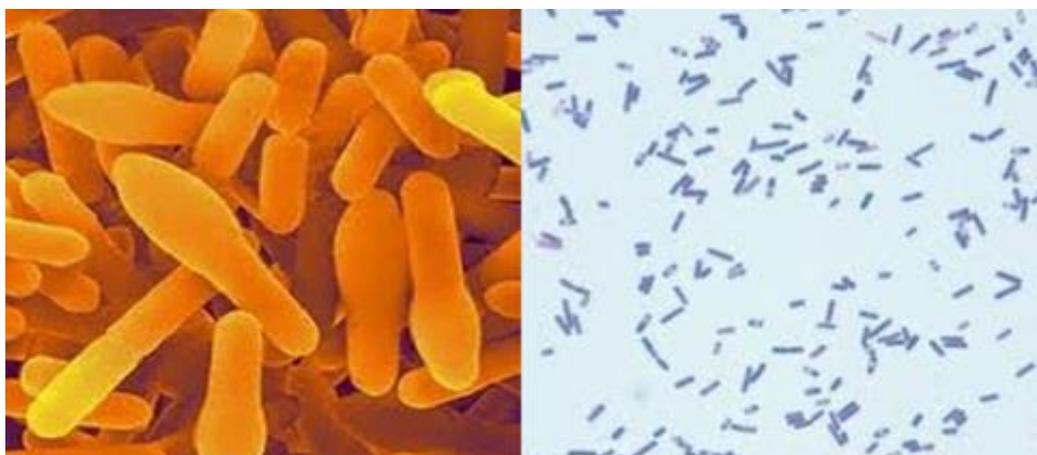


Рис. 18. *Clostridium sporogenes*

Clostridium perfringens (рис. 19) – крупная грамположительная палочка размером (5–8) (1–2) мкм, неподвижная, образует эндоспоры. Расположение спор субтерминальное или центральное. В организме человека или животного данная палочка способна образовывать капсулу. *C. perfringens* – анаэроб, быстро растет на питательных средах, особенно с добавлением глюкозы. В глубине МПА колонии имеют вид дисков или плотных комочков ваты. На поверхности кровяного агара образует влажные серовато-зеленого цвета колонии с четкой зоной гемолиза. На среде Вильсона-Блера, содержащей хлорид железа, колонии дискообразные, интенсивно черного цвета с потемнением среды вокруг колонии. Рост микроорганизма в молоке сопровождается образованием губчатого сгустка, «подбрасываемого» к ватной пробке пробирки за счет газообразования. Оптимальная температура роста 37–39 °С. Вегетативные формы *Cl. perfringens* погибают при температуре 80 °С через 30 мин, споры выдерживают кипячение в течение 1–2 ч.

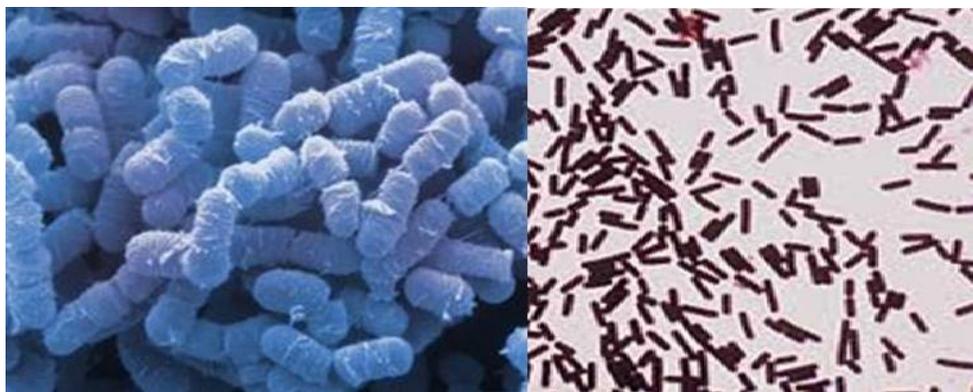


Рис. 19. *Clostridium perfringens*

Энтерококки. Энтерококки – молочнокислые стрептококки кишечного происхождения, лишь недавно перенесенные из рода *Streptococcus* в новый род *Enterococcus*, включающий 16 видов. Типовой вид – *Enterococcus faecalis*. В настоящее время энтерококки наряду с бактериями группы кишечной палочки считаются санитарно-показательными микроорганизмами.

Enterococcus faecalis – клетки сферической или овальной формы размером (0,6–2,0) (0,6–2,5) мкм, располагаются парами или короткими цепочками. Грамположительны, эндоспор и капсул не образуют и, как правило, неподвижны. Факультативные анаэробы, ферментируют углеводы с образованием L(+)-молочной кислоты. Оптимальная температура роста составляет 37–39 °С, температурный диапазон роста – 10–45 °С. На МПА энтерококки образуют мелкие, круглые, выпуклые блестящие колонии с ровными краями серовато-голубоватого оттенка.

Энтерококки довольно устойчивы к неблагоприятным факторам внешней среды. Они выдерживают кратковременное нагревание при температуре 75–80 °С, поэтому занимают большой объем в остаточной микрофлоре пастеризованного молока. Энтерококки обладают протеолитическими ферментами и вызывают появление горького вкуса в молочных продуктах и сырах. За счет выделяемого ими сычужного фермента происходит преждевременное свертывание молока.

Маслянокислые бактерии. Маслянокислые бактерии – *Clostridium butyricum* и *Clostridium tyrobutyricum* – относятся к группе сахаролитических клостридий, которые сбраживают сахара с образованием преимущественно масляной и уксусной кислот и газов (CO_2 и H_2O). Благодаря своей газообразующей способности маслянокислые бактерии вызывают такие виды порчи молочных продуктов, как «позднее вспучивание» сыров, бомбаж консервов. Присутствие масляной кислоты придает продукту прогорклый вкус.

Clostridium butyricum – палочки размером (0,3–2,0) (1,5–20) мкм с закругленными концами, часто располагающиеся парами или короткими цепочками; капсул не образуют. Клетки со спорами могут иметь форму булавы или теннисной ракетки. В молодых культурах грамположительные и подвижные (перитрихи). В старых культурах подвижность утрачивается и окраска по Граму варьируется. Споры овальные или сферические, их диаметр больше диаметра клетки. облигатные анаэробы, оксидазо и каталазоотрицательные. Оптимальная температура роста составляет 30–37 °С, температурный диапазон – 10–65 °С. Оптимальное значение pH 7,0–7,4.

Термоустойчивые лактобациллы. В молочных продуктах часто размножаются термоустойчивые молочнокислые палочки, способные выдерживать кратковременную пастеризацию при температуре 85–90 °С. Размножаясь в молоке и молочных продуктах, эти бактерии накапливают значительное количество молочной кислоты и вызывают порок «излишне кислый вкус», при этом титруемая кислотность может возрасти до 200–220 °Т. Иногда развитие термоустойчивых молочнокислых палочек приводит к появлению в продукте тягучести и нечистого вкуса.

Одним из представителей этой группы является *Lactobacillus delbrueckii*.

Lactobacillus delbrueckii. Данный вид включает три подвида:

L. delbrueckii ssp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* ssp. *lactis*. Палочки с закругленными концами размером (0,5–0,8) (2,0–9,0) мкм, грамположительные, неподвижные; эндоспор и капсул не образуют. В клетках часто наблюдается зернистость. Факультативные анаэробы, ферментируют углеводы с образованием D(–)-молочной кислоты. Оптимальная температура роста составляет 45–55 °С, температурный диапазон – от 20 до 65 °С. Каталазо- и цитохромотрицательные.

Мицелиальные грибы. Мицелиальные грибы способны размножаться на молочных продуктах как при низких температурах, так и при пониженных значениях активности воды a_w – от 0,94 до 0,60 (например, *Xeromyces bisporus*). Присутствие плесени на пищевом продукте делает его непривлекательным для потребителя. Наличие у мицелиальных грибов активных протеолитических и липолитических ферментов приводит к возникновению таких видов порчи, как неприятный запах, прогорклые вкус и запах, изменение структуры продукта. Среди мицелиальных грибов встречаются виды, образующие микотоксины, что представляет опасность для здоровья человека. Наиболее часто на молочных продуктах размножается молочная плесень – *Geotrichum candidum*.

Geotrichum candidum (синоним *Endomyces lactis*) (рис. 20) – молочная плесень, образующая белый бархатистый мицелий, гифы которого распадаются на отдельные клетки – *оидии*, называемые также *артроспорами*.

Geotrichum candidum относится к высшим несовершенным грибам – дейтеромицетам.

Молочная плесень часто развивается на поверхностях кисломолочных продуктов, сыров, сливочного масла. Мицелий молочной плесени никогда не темнеет и не образует цветного плодоношения. Молочная плесень обладает активными протеазами и липазами, поэтому при размножении в молочных продуктах вызывает их прогоркание и появление неприятного специфического запаха.



Рис. 20. Молочная плесень *Geotrichum candidum* (синоним *Endomyces lactis*)

Mucor plumbeus (рис. 21) является представителем низших грибов – зигомицетов. На сусле-агаре образует пушистый мицелий темно-серого цвета с черными точками – спорангиями со спорангиоспорами. Вызывает порчу творога и сыров.

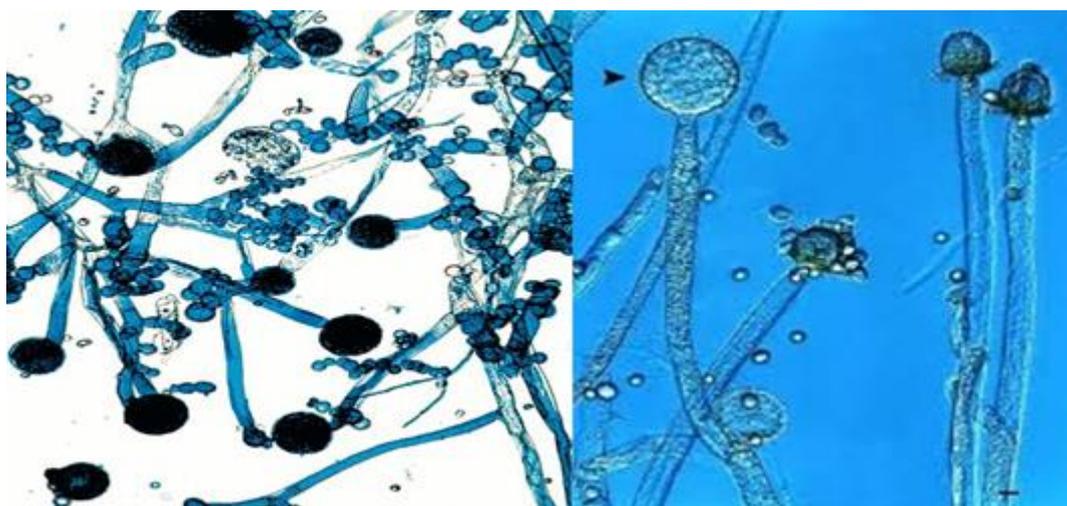


Рис. 21. *Mucor plumbeus*

Penicillium commune (рис. 22) относится к высшим грибам – аскомице-

там. Этот вид на сусле-агаре образует бледно-зеленые колонии со светло-коричневой обратной стороной. Кисточки крупные, трехмутовчатые; конидии сферической формы, гладкие.

Penicillium commune является дикой разновидностью культурной плесени *Penicillium roqueforti* и чаще всего вызывает порчу сыров.



Рис. 22. *Penicillium commune*

Aspergillus glaucus (рис. 23) относится к высшим грибам – аскомицетам. На сусле-агаре образует плоские бархатистые колонии: сначала – белые, затем – серо-голубые с белым краем. Он хорошо растет на поверхности молочных продуктов при низких температурах хранения.



Рис. 23. *Aspergillus glaucus*

Catenularia fuliginea образует мелкие, медленно растущие колонии шоколадно-коричневого цвета. Конидии блестящие, желто-коричневые, отходящие от концевых гифов воздушного мицелия в виде длинных цепочек. Относится к высшим несовершенным грибам – дейтеромицетам. Этот вид часто размножается в сгущенном молоке с сахаром, образуя комки или «пуговицы» шоколадного цвета.

Monilia nigra – переходная форма от дрожжей к мицелиальным грибам. Вначале колонии сходны с колониями дрожжей, лишь позднее клетки удлиняются и образуют настоящий мицелий, от которого поднимаются воздушные

нити. Мицелий эндогенный, выступает на поверхность в виде плотных пучков. Конидии формируются в цепочки, а затем распадаются на отдельные клетки.

Monilia nigra образует на корке твердых сыров черные пятна, проникающие внутрь сыра.

Monilia roseum способна размножаться на поверхности сливочного масла, образуя розовые пятна.

Cladosporium herbarum – гроздевидная плесень (рис. 24) Образует бархатистые колонии оливково-зеленого цвета. Мицелий многоклеточный, слабоветвистый. Спороносцы представляют собой тонкие древовидные ветвящиеся гифы, оканчивающиеся гладкими сферическими или овальными спорами. Обратная сторона колоний, прилегающая к субстрату, имеет черную окраску. Размножается на поверхности мяса, сливочного масла, сыра при холодильном хранении, образуя черные пятна.



Рис. 24. Гроздевидная плесень *Cladosporium herbarum*

Контрольные вопросы

1. Перечислите аэробные спорообразующие бактерии.
2. Дайте характеристику термоустойчивых лактобацилл.
3. Характеристика мицелиальных грибов.
4. Назовите маслянокислые бактерии.
5. Перечислите бактерии относящиеся к группе аэробные неспорообразующие бактерии.
6. Перечислите бактерии относящиеся к группе анаэробные спорообразующие палочки.

ТЕМА 13. ИССЛЕДОВАНИЕ НА ПРИСУТСТВИЕ СТАФИЛОКОККОВ И МАСТИТНЫХ СТРЕПТОКОККОВ

Задание: Распознавать маститное молоко, обнаруживать антибиотики.

Исследование молока от коров, больных маститом

Возбудителями воспалительного процесса вымени могут быть различные

микроорганизмы, в результате действия которых реакция молока отклоняется от нормы и реакция молока из слабокислой переходит в щелочную. Молоко становится солено - горьким, в нем появляются хлопья или тянущиеся нити. Позднее выделяется гнойная жидкость, иногда с неприятным запахом. Наиболее опасное поражение вымени вызывают маститные стрептококки - *Streptococcus mastitidis*, *Streptococcus aqalactiae* и стафилококки - *Staphylococcus aureus*.

Морфологические и культуральные свойства возбудителей мастита

Указанные выше стрептококки сходны между собой. Величина кокков 0,5-1 мкм в диаметре. Они неподвижны, спор и капсул не образует. Грамположительны. Не образуют пигментов. На агаре образуют мелкие, слегка мутные колонии. Желатин не разжижают. При отстое молока, полученного от больных коров, на дне сосуда оседает гной, фибрин и микробные клетки. В мазках из мастичного молока - *Streptococcus mastitidis*, наблюдается в виде коротких цепочек, заключенных в лейкоцитах, *Streptococcus aqalactiae* - в виде небольших скоплений; встречаются и диплококки.

Исследование молока, на присутствие стафилококков

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) обнаруживаемый в маститном молоке, - это сферический кокк диаметром 0,8-0,9 мкм. Встречаются отдельные кокки, диплококки, короткие цепочки. Спор и капсул не образует, неподвижный. Легко окрашивается всеми анилиновыми основными красками. Грамположительный, на всех обычных питательных средах растет в виде скоплений колоний неправильной формы. Оптимальная температура для роста 34-37°C. Факультативный анаэроб. При посеве штрихом на МПА растет в виде желтого налета с блестящей поверхностью. При росте на картофеле интенсивно образует желтый пигмент. На кровяном агаре вокруг колоний выражена зона гемолиза. Незначительно разжижает желатин. На МПБ дает равномерную муть, среда приобретает коричнево-желтый оттенок. Хорошо растет на молоке, разлагает лактозу и вызывает свертывание молока. Содержит кислые протеазы, что вызывает пептонизацию сгустка.

Для распознавания маститного молока ставят каталазную, лейкоцитную и бромтимоловую пробы, проводят бактериологическое и бактериоскопическое исследование.

Каталазная проба. В каталазник Функе вносят 15мл молока подогретого до 25°C и 5мл 1 %-ного раствора перекиси водорода. Жидкости перемешивают и внутреннюю трубку каталазника Функе вставляют так, чтобы уровень жидкости был на ее нулевом делении. Каталазник помещают в водяную баню при температуре 25°C на 2ч. Отсчитывают высоту уровня жидкости, которая соответствует объему выделившегося кислорода. При выделении свыше 2 см³ кислорода молоко считается подозрительным на мастит.

Лейкоцитная проба. В центрифужные градуированные пробирки вносят по 10мл молока от каждой пробы и центрифугируют 5 минут при частоте вращения 1200 об/мин. При наличии в пробирке осадка, достигающего делений 0,5-1, молоко считается подозрительным; наличие осадка, достигающего деле-

ний 1 -2, указывает на молоко от маститных коров. При микроскопии осадка такого молока обнаруживается большое количество многоядерных лейкоцитов и стрептококков.

Бромтимоловая проба. В углублениях на фарфоровой пластинке 5 капель молока смешивают с 1 каплей 0,2%-ного раствора бромтимолового синего в 60 -ном спирте. Молоко, полученное от здоровых коров, окрашивается в желтый цвет (р_i 1-6,3-6,5); от маститных - в зеленый (рП'6,5-7,0) и даже синий (рН=7,0-7,5).

При тяжелых формах мастита реакция молока может быть кислой, и оно окрашивается в желтый цвет.

Проба отстаивания (проба Мутавина). Для проведения пробы из каждой доли вымени (соска) берут 10-15мл молока в пробирки и оставляют их в штативе при температуре 4-8°C. Пробирки просматривают через 2-3ч и вторично через 16-24ч, при этом определяют цвет молока, наличие осадка и примесей, высоту слоя сливок и их внешний вид. Маститное молоко бывает синеватым, водянистым. Слой сливок менее 0,5мм указывает на заболевание. Признаком заболевания является также розовый цвет сливок (наличие в них эритроцитов). Хлопья указывают на большое количество лейкоцитов.

Проба со щелочью. На предметное стекло наносят 5 капель молока, добавляют 2 капли 1Н раствора NaOH и смешивают в течение 20с. Если молоко доброкачественное, образуется прозрачная смесь, если маститное, наблюдаются хлопья и нити.

Контрольные вопросы

- 1 Возбудители мастита. Изменения, вызываемые ими в молоке.
- 2 Сущность и проведение проб для распознавания молока, полученного от маститных коров.
- 3 Техника определения бактериофага в молоке и в воздухе.

ТЕМА №14 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ В МОЛОКЕ

Задание: Изучить и практически освоить прямые и косвенные методы определения антибиотиков в молоке.

Антибиотики (пенициллин, тетрациклин, стрептомицин и др.) попадают в молоко при лечении мастита у коров. Они нарушают молочнокислое брожение. Для установления наличия антибиотиков и моющих или дезинфицирующих средств в молоке используют прямые и косвенные методы.

Метод прямого микроскопирования

Метод основан на подавлении размножения бактерий и изменении их формы под действием антибиотиков. В пробирку отбирают 10 мл исследуемого молока, закрывают корковой пробкой и помещают в водяную баню при 80-85° на 5 минут. Затем быстро охлаждают до 40°C.

В контрольную пробирку отбирают 10 мл молока, которое заведомо не содержит антибиотиков. В обе пробирки добавляют по 3-4 капли свежей культуры - чувствительного к антибиотикам термофильного стрептококка, выращенного на гидролизованном или обезжиренном молоке. Тщательно встряхнув закрытые пробками пробирки, помещают их в водяную баню при 40°C на 90 минут. Затем микроскопируют окрашенные препараты с иммерсионным объективом. На присутствие антибиотиков указывает резкое уменьшение количества клеток в испытуемом молоке, по сравнению с контролем, наличие утолщенных форм клеток и их скопление.

Метод восстановления индикаторов

а) Использование метиленового синего.

В пробирку с исследуемым и контролируемым молоком вносят по 1 мл раствора метиленового синего и затем 3-4 капли свежей культуры чувствительного к антибиотикам термофильного стрептококка.

Встряхнув, пробирки ставят в водяную баню при 38-40°C на 5,5 ч. Следят за изменением цвета в исследуемом образце по сравнению с контролем, который должен восстанавливаться. Наличие синего цвета в исследуемом молоке указывает на присутствие антибиотиков.

б) Использование резазурина.

В пробирки с исследуемым и контрольным молоком вносят по 1 мл раствора резазурина; 3-4 капли чувствительного к антибиотикам термофильного стрептококка, перемешивают и ставят в водяную баню на 45 минут. Отмечают изменение цвета исследуемого образца по сравнению с контролем. Фиолетово-розовый или сине-стальной цвет молока указывает на присутствие антибиотиков.

Контрольные вопросы

1. Техника определения антибиотиков в молоке прямым методом.
2. Техника определения антибиотиков в молоке косвенным методом.

ТЕМА 15. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ СГУЩЕННОГО, СУХОГО МОЛОКА И МОРОЖЕНОГО

Задание: Произвести посеы сгущенного, сухого молока и мороженого на МПА для определения общего количества бактерий.

Исследование микрофлоры сгущенного молока с сахаром.

Стойкость сгущенного молока достигается пастеризацией и добавлением сахарозы в количестве 18% по отношению к сырому молоку. При этом подавляется жизнедеятельность большей части микрофлоры молока. Если отношение содержания сахарозы в сгущенном молоке к суммарному количеству сахара и воды равно 63-64%, то количество бактерий при хранении продукта не увеличивается.

Во избежание попадания микрофлоры в продукт, для его приготовления используется пастеризованное молоко высшего качества. Исследование сгущенного молока с сахаром проводится по той же методике, что и обычного молока.

Для отбора проб из банки со сгущенным молоком крышку фламбируют ватой, смоченной спиртом. Банку открывают стерильным ножом и немедленно закрывают крышкой стерильной чашки Петри. После тщательного перемешивания ложечкой отбирают навеску 10 г в стерильную колбу. Смешивают с 90 мл стерильной воды 37-40°C. Из приготовленной таким образом суспензии готовят разведения обычным способом.

Посевы производят на МПА - разведения 1:10, 1:100, 1:1000 для определения общего количества бактерий, на молочный агар - разведения 1:10, 1:100 для количественного учета протеолитических бактерий; на стерильно-цельное молоко - разведения 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 для подсчета маслянокислых бактерий; на сусло - агар - разведение 1:10 для подсчета дрожжей и плесневых грибов; на среду Кесслера - разведения 1:10, 1:100 для определения *Escherichia coli*. Посевы в чашках Петри выращивают в термостате при 30°C в течение 3 суток. Затем проводят подсчет и микроскопию препаратов из колоний.

Особую опасность представляют плесневые грибы, дрожжи и пигментообразующие микрококки, вызывающие загустевание молока и пептонизацию казеина. Дрожжи вызывают бомбаж, грибы - плесневение. Источником попадания в продукт этих микроорганизмов является чаще всего, хранившийся сахар. Кроме того, плесневые грибы вызывают образование колоний в виде подушечек различных размеров и окраски у дна банки по швам.

Развитие пигментовых микрококков способно вызывать загустевание с появлением неприятного, сырного запаха. При этом образуется молочная кислота. А под действием сычужных ферментов изменяются белки молока.

Согласно стандартам, сгущенные с сахаром молочные консервы по микробиологическим показателям должны удовлетворять следующим требованиям. Общее количество бактерий в 1 г допускается не более 50000. При посеве в среду Кесслера в три параллельные пробирки по 1 г консервов в каждую, присутствие кишечной палочки допускается не более, чем в одной пробирке.

Исследование сухого молока

В сухой стерильной бюксе взвешивают 1 г сухого молока. Переносят навеску в пробирку с 9мл стерильной воды при 37-40 °С, взбалтывают до растворения 10-15 минут. Из этой пробирки готовят последующие разведения

Посевы производят на МПА - разведения 1:10, 1:100, 1:1000 для определения общего количества бактерий; на молочный агар - разведения 1:10, 1:100 для количественного учета протеолитических бактерий; на среду Кесслера - разведения 1:10 и 1:100 для определения титра; на стерильное молоко - разведения 1:10, 1:100, 1:1000 для количественного учета молочнокислых бактерий.

Согласно стандарту сухое молоко в зависимости от бактериальной обсемененности разделяют на высший и первый сорт.

Общее количество бактерий в 1 г сухого молока допускается не более 50000 для молока высшего сорта и 100000 для 1 сорта. Содержание патогенных бактерий и кишечной палочки не допускается.

Исследование мороженого

С поверхности продукта стерильной ложечкой снимают навеску 50 г. От расфасованного мороженого берут из упаковки один, два образца. Навеску мороженого расплавляют в стерильной склянке при 40-45°C в течение 10-15 минут и из этой пробы готовят разведения в стерильной воде 40-45 °С. Посевы делают на МПЛ - разведения 1:1000, 1:10000, 1:100000. Титр кишечной палочки устанавливают путем посева разведений 1:10, 1:100 на среду Кесслера.

Посевы в чашках Петри выращивают в течение 3 суток при 30°C в термостате, на среде Кесслера - при 43°C.

При посеве в три параллельные пробирки со средой Кесслера по 0,1 г мороженого наличие кишечной палочки допускается не более, чем в одной пробирке. В мороженом не должно содержаться патогенных и токсигенных микробов.

Контрольные вопросы

1. Отбор и подготовка для исследования проб сгущенного молока, сухого молока и мороженого.
2. Питательные среды, используемые для определения общего количества бактерий, протеолитических, маслянокислых бактерий, дрожжей и плесневых грибов.
3. Определение Coli-титра и бактериологическая оценка доброкачественности продукта.
4. Что представляют собой молочные консервы?
5. На каких принципах основано консервирование молочных продуктов?
6. Назовите источники обсеменения микроорганизмами сгущенного стерилизованного молока и сгущенного молока с сахаром.
7. Перечислите пороки сгущенного стерилизованного молока.
8. Как влияют различные группы микроорганизмов на качество сгущенного молока с сахаром, сухого молока?
9. Какие микробиологические показатели определяют при контроле качества сгущенного молока?
10. Как контролируют производство сухих молочных консервов и мороженого?

ТЕМА 16. САНИТАРНО-ГИГИЕНИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ УСЛОВИЙ ПРОИЗВОДСТВА

Задание: Ознакомиться с организацией санитарно-гигиенического контроля на предприятиях молочной промышленности. Освоить микробиологические методы, позволяющие оценить санитарное состояние воды, воздуха производственных помещений, оборудования, тары, упаковочных и вспомогательных материалов, рук и спецодежды работников.

Организация санитарно-гигиенического контроля на предприятиях молочной промышленности

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

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

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

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

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

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

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

Оценка санитарного состояния воздуха производственных помещений

Воздух производственных помещений может стать источником микробного загрязнения молочных продуктов.

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

Для определения микроорганизмов в воздухе используют седиментационный и аспирационный методы.

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

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

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

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

Оценка санитарного состояния воды

Вода, используемая на предприятиях пищевой промышленности, должна отвечать требованиям ГОСТа на питьевую воду.

Один раз в квартал при пользовании городским водопроводом и один раз в месяц при наличии собственных источников водоснабжения в воде для оценки ее санитарного состояния определяют общую бактериальную обсемененность (КМАФАнМ), содержание кишечных палочек и наличие патогенных микроорганизмов. Последний анализ выполняется службой СЭС.

Согласно требованиям ГОСТа общая бактериальная обсемененность воды не должна превышать значения 100 КОЕ/см^3 , коли-титр допускается не менее 300 см^3 , а коли-индекс – не более 3.

Коли-титр – наименьший объем воды, в котором допускается наличие одной кишечной палочки.

Коли-индекс – количество кишечных палочек в 1 дм^3 воды.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Перед анализом тампон смачивают стерильной водой или физиологическим раствором и обтирают им обе руки и пальцы каждого работника. Тампон ополаскивают в воде и всю смывную воду высевают в 5 см³ среды Кесслера или Кода. Наличие в смыве кишечной палочки недопустимо.

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

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

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

Микробиологическое исследование воздуха

Проводят седиментационным методом.

Определяют количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) и содержание микроскопических грибов и дрожжей.

Для каждого определения готовят по 2 чашки Петри с 10-15 см³ мясопептонного агара или среды для определения КМАФАнМ и сусло-агара или среды Сабуро. Чашки переносят в исследуемое помещение и помещают на развернутую бумагу, в которой они стерилизовались. Далее сдвигают крышки на самый край бортика чашки так, чтобы вся поверхность агаризованной среды была открыта полностью.

Чашки оставляют открытыми 5, 10 или 15 минут (время экспозиции) в зависимости от загрязненности воздуха. Затем их закрывают крышками, переворачивают вверх дном и помещают в термостат. Чашки с МПА выдерживают в течение 24-48 часов при 37⁰С, а со средой Сабуро – в течение 2-3 суток при 25⁰С.

Подсчет колоний производят визуально и с помощью лупы. Подсчет колоний грибов и дрожжей ведут отдельно. Для определения содержания микроорганизмов в 1 м³ пользуются формулой, предложенной Омелянским, согласно которой на поверхности чашки в 100 см² оседает в течение 5 минут столько микроорганизмов, сколько их содержится в 10 л воздуха:

$$X = a \cdot 100 \cdot 5 \cdot 100 / ST,$$

где, a – число выросших в чашках колоний (среднее из двух);

S – площадь чашки Петри, см^2 ;

T – время экспозиции, мин;

100 – пересчет площади чашки на 100 см^2 ;

5 – время экспозиции по Омелянскому;

100 – пересчет на 1 м^3 воздуха.

Микробиологическое исследование воды

Отбор проб. Кран или край спускной трубы обжигают зажженным ватным тампоном, пропитанным спиртом. Открывают кран и в течение 10-15 минут воду спускают, после чего производят отбор пробы в стерильную колбу (объем пробы не менее 500 см^3). Колбу закрывают ватно-марлевой пробкой над огнем.

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

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

Определение содержания колиформных бактерий методом бродильных проб

Метод бродильных проб (или титрационный метод) основан на накоплении бактерий установленного объема воды в жидкую накопительную среду, с последующим пересевом на дифференциально-диагностическую среду для идентификации выросших колоний.

Первый этап исследования заключается в посеве 3-х объемов воды по 100 см^3 , 3 объемов по 10 см^3 и 3 объемов по 1 см^3 в лактозопептонную среду. Посев 100 и 10 см^3 в 10 и 1 см^3 концентрированной лактозо-пептонной среды, посев 1 см^3 пробы проводят в 10 см^3 среды обычной концентрации. Для определения можно также использовать среду Кесслера. Посевы инкубируют при темпера-

туре 37⁰С в течение 24-48 часов. Если во всех колбах и пробирках роста кишечных палочек не обнаружено, то это значит, что коли-титр более 333 см³.

На втором этапе исследований из пробирок и колб, где отмечено наличие роста и образование газа, производят высеивание петлей в сектора среды Эндо. Посевы на среде Эндо выдерживают в термостате при 37⁰С в течение 18-20 часов. Отсутствие колоний, типичных для бактерий группы кишечных палочек, дает отрицательный ответ о содержании этих микроорганизмов в исследуемом объеме воды.

Определение колиформных бактерий методом мембранных фильтров

Метод основан на фильтрации установленного объема воды через мембранные фильтры, выращивании посевов на дифференциально-диагностической среде и последующей идентификации выросших колоний.

Для анализа точно отмеряют 300 см³ воды и фильтруют этот объем через стерильный мембранный фильтр. После окончания фильтрования фильтр осторожно приподнимают фламбированным пинцетом и переносят в чашку Петри со средой Эндо. Поверхность фильтра с осевшими на ней микроорганизмами должна быть обращена вверх. Чашки с фильтрами ставят в термостат дном вверх и инкубируют посевы при температуре 37⁰С в течение 24 часов.

Результат считается отрицательным, если на фильтрах вообще не выросли колонии, или выросли колонии с неровными краями и поверхностью.

При наличии типичных лактозоположительных колоний, дающих отпечаток на обратной стороне мембранного фильтра и среде – темно красных, красных с металлическим блеском, а также лактозоотрицательных – розовых без отпечатков, подсчитывают число колоний каждого типа.

Для идентификации отбирают не менее 5 колоний каждого вида и делают посев на скошенный питательный агар. Посевы инкубируют при 37⁰С в течение 16-18 часов. Далее проводят биохимические тесты с чистыми культурами: оксидазный тест и тест образования кислоты и газа при ферментации лактозы.

Исследование чистоты рук

Закрепленный на деревянном или металлическом стержне стерильный тампон смачивают стерильной водой (или физиологическим раствором) и протирают ими ладони, тыльную поверхность рук, под ногтями и между пальцами обеих рук. Тампон погружают в пробирку с водой, в которой проводилось смачивание, содержимое пробирки хорошо взбалтывают, отбирают 1 см³ и готовят разведения (1:10 и 1:100).

Для определения КМАФАнМ проводят посев разведений в чашки Петри на мясопептонный агар с последующим термостатированием при 37⁰С в течение 48 часов. Остаток смыва вместе с тампоном высеивают в пробирки с 5 см³ среды Кесслера и проводят культивирование при 43⁰С в течение 24 часов.

Учет результатов исследований. Чистоту рук оценивают по количеству микроорганизмов в 1 см³ смыва при отсутствии газообразования в пробирке со средой Кесслера с поплавком (при отсутствии кишечной палочки). Состояние рук считается: отличным, если в 1 см³ смыва содержится до 1000 клеток микроорганизмов; хорошим, если содержание микроорганизмов составляет от 1000 до 5000 в 1 см³ смыва; удовлетворительным – при количестве микроорганизмов в 1

см³ смыва от 5000 до 10000. Если количество микроорганизмов в 1 см³ смыва превышает 10000 клеток, то санитарное состояние рук плохое (руки грязные).

Контрольные вопросы

- 1 . Какая служба осуществляет государственный санитарный надзор на предприятиях молочной промышленности? Какие формы государственного санитарного надзора Вы знаете?
- 2 . Кто осуществляет внутриведомственный санитарный надзор на предприятиях молочной промышленности?
- 3 . По каким микробиологическим показателям проводят оценку санитарно-гигиенического состояния воздуха?
- 4 . В чем сущность седиментационного метода определения микроорганизмов в воздухе?
- 5 . Каким образом можно снизить бактериальную обсемененность воздуха?
- 6 . Какие микробиологические показатели определяются согласно ГОСТу в питьевой воде для оценки ее санитарного состояния?
- 7 . Каким образом готовятся смывы с оборудования для оценки его санитарного состояния?
- 8 . Как проводят контроль чистоты трубопроводов, шлангов, рукавов?
- 9 . Какие микробиологические показатели определяют в смывах с оборудования, трубопроводов, посуды?
10. Каким образом проводят микробиологический контроль вспомогательных и упаковочных материалов?
11. Как проводят микробиологический контроль чистоты рук работников?
12. Как проводят контроль обработки рук работников хлорной известью?
13. Как определить содержание микроорганизмов в 1 м³ воздуха?
14. Что такое коли-титр, коли-индекс воды? Какими методами определяется содержание кишечных палочек в питьевой воде?
15. Какие способы обеззараживания воды Вам известны?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Банникова Л.А., Королева Н.С., Семенихина В.Ф. Микробиологические основы молочного производства: справочник / под ред. Я.И. Костина. М.: Агропромиздат, 1987. 400 с.
2. Еремина И.А. Микробиология молока и молочных продуктов: учеб. пособие. Кемерово: КемТИПП, 2004. 80 с.
3. Еремина И.А. Методические указания к выполнению лабораторных работ по микробиологии молока и молочных продуктов дневной формы обучения. Кемерово: КемТИПП, 2004. 56 с.
4. Красникова Л.В., Гунькова П.И., Маркелова В.В. Микробиология молока и молочных продуктов: лабораторный практикум: учеб.-метод. пособие. СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. 85 с.
5. Микробиология продуктов животного происхождения / Г.Д. Мюнх, Х. Заупе, М. Шрайтер и др.; пер. с нем. М.: Агропромиздат, 1985. 592 с.
6. Рябцева С.А., Ганина В.И., Панова Н.М. Микробиология молока и молочных продуктов : учебное пособие для вузов. 4-е, стер. СПб.: Лань, 2021. 192 с. - Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/162387>
7. Рябцева С.А., Ганина В.И., Панова Н.М. Микробиология молока и молочных продуктов. СПб.: Лань, 2018. 192 с. - Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/102586>
8. Рябцева С.А., Ганина В.И., Панова Н.М. Микробиология молока и молочных продуктов: учеб. пособие. 2-е изд., стер. СПб.: Лань, 2019. 192 с. - Текст : электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/121456>
9. Рябцева С.А., Ганина В.И., Панова Н.М. Микробиология молока и молочных продуктов: учеб. пособие. 3-е изд., стер. СПб.: Лань, 2020. 192 с. - Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/139276>
10. Степаненко П.П. Микробиология молока и молочных продуктов. М.: Колос, 1996. 271 с.
11. Степаненко П.П. Руководство по микробиологии молока и молочных продуктов. М.: Изд-во Лира, 2005. 653 с.

Учебное издание

Рябичева Ангелина Евгеньевна, Гулаков Андрей Николаевич,

Шепелев Сергей Иванович

МИКРОБИОЛОГИЯ МОЛОКА И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

учебно-методическое пособие
для проведения практических занятий
студентами направления подготовки
19.03.03 «Продукты питания животного происхождения»
профиль «Технология мяса и мясных продуктов»

Редактор Осипова Е.Н.

Подписано к печати 06.04.2022 г. Формат 60x84 ¹/₁₆.
Бумага офсетная. Усл. п. л. 4,35. Тираж 25 экз. Изд. № 7245.

Издательство Брянского государственного аграрного университета
243365 Брянская обл., Выгоничский район, с. Кокино, Брянский ГАУ