



Государственное бюджетное профессиональное образовательное учреждение Воронежской области «Бутурлиновский механико-технологический колледж»

МИКРОБИОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ И ГИГИЕНА В ПИЩЕВОМ
ПРОИЗВОДСТВЕ
ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ

для студентов специальности 19.02.02 «Технология хранения и переработки зерна»

Бутурлиновка - 2018г

Автор: Жидкова Е.В. - преподаватель спецдисциплин ВКК

Лабораторный практикум предназначен для использования студентами 3 курса базовой подготовки специальности 19.02.02 «Технология хранения и переработки зерна» при выполнении лабораторных работ по дисциплине «Микробиология, санитария и гигиена в пищевом производстве».

Рассмотрено и одобрено на заседании цикловой комиссии общепрофессиональных и специальных дисциплин специальности 19.02.02

Протокол № от 2018г

Председатель цикловой комиссии:

Жидкова Е. В.

Содержание

Пояснительная записка	3
Правила работы в микробиологической лаборатории	4
Лабораторное занятие №1. «Изучение устройства микроскопа и овладение техникой микроскопирования. Приготовление препаратов различных культур микроорганизмов в живом и окрашенном виде».	6
Лабораторное занятие № 2. «Приготовление питательных сред. Освоение техники посева и пересева».	10
Лабораторное занятие №3. «Определение содержания головни, спорыньи и фузариоза в зерне пшеницы».	13
Лабораторное занятие №4 «Анализ смывов с рук персонала, оборудования с целью контроля чистоты».	16

Пояснительная записка

Лабораторный практикум разработан в соответствии с действующей рабочей программой учебной дисциплины микробиологии, санитарии и гигиены в пищевом производстве, принятой ГБПОУ ВО «БМТК» для студентов, обучающихся по специальности 19.02.02 «Технология хранения и переработки зерна».

При изучении общепрофессиональных дисциплин требуются глубокие знания микробиологических процессов, лежащих в основе многих биотехнологических производств и служащих гарантией защиты окружающей среды от антропогенного воздействия.

Помимо приобретения теоретических знаний по микробиологии будущим специалистам необходимы лабораторно-практические занятия, являющиеся по сути небольшими научно-исследовательскими работами. Будущий специалист техник должен уметь: - работать с лабораторным оборудованием;

- определять основные группы микроорганизмов;
- проводить микробиологические исследования и давать оценку полученным результатам;
- соблюдать санитарно-гигиенические требования в условиях пищевого производства;
- производить санитарную обработку оборудования и инвентаря;
- осуществлять микробиологический контроль пищевого производства.

Выполнение лабораторных работ обеспечивает закрепление теоретических знаний студентов, развитие навыков по микробиологическому контролю и способностей к самостоятельным выводам и обобщениям.

Данный лабораторный практикум предлагает:

объединить лабораторные работы по одной теме или имеющие одно смысловое содержание так, чтобы удобно было их организовать во времени, как это требует специфика микробиологических анализов;

распределить занятия так, чтобы загруженность последнего занятия давала возможность обсудить результаты анализа, провести зачет по выполненной работе;

сконцентрировать наиболее важный учебный материал, позволяющий студентам без излишней загруженности освоить практические навыки работы в микробиологической лаборатории;

дать методику проведения анализа с указанием сущности метода, техники выполнения, правил обработки результатов;

использовать те методы микробиологического анализа, которые предусмотрены ГОСТом.

Содержание лабораторных работ спланировано следующим образом:

Тема и цель работы.

Материальное обеспечение лабораторной работы.

Рекомендации по выполнению лабораторной работы, задание, пояснение к работе, методика проведения анализов, формы для составления отчета.

Ввиду сложности некоторых методов и длительности выращивания микроорганизмов в отдельных случаях часть лабораторного материала готовит заранее преподаватель, но методика приготовления его приводится.

Навыки, приобретенные на лабораторных занятиях, необходимы для проведения микробиологического контроля производства, цель которого заключается в том, чтобы своевременно выявить нарушение санитарного состояния производства и оборудования, обнаружить места и пути микробного загрязнения, принять необходимые меры по ликвидации этих опасных очагов и добиться выпуска продукции высокого качества.

Правила работы в микробиологической лаборатории

Работа в микробиологической лаборатории требует строгого соблюдения специальных правил, что определяется двумя основными положениями.

Первое – в микробиологической практике используют, главным образом, чистые культуры микроорганизмов, т. е. популяции микроорганизмов одного вида, часто являющихся потомством одной клетки.

Поскольку в воздухе, на поверхности окружающих нас предметов, на одежде, руках, волосах всегда имеется большое количество разнообразной микрофлоры, то для обеспечения стерильности исследований и во избежание загрязнения культур работа должна проводиться с соблюдением правил асептики.

Второе – при исследованиях с неидентифицированными микроорганизмами, при их выявлении из объектов окружающей среды и техногенных потоков, могут быть выделены патогенные и условно патогенные микроорганизмы.

Кроме того, клетки как сапрофитных, так и патогенных микроорганизмов могут являться аллергенами для определенных индивидуумов. Таким образом, для получения достоверных результатов исследований, для обеспечения личной безопасности и безопасности окружающих необходимо соблюдение определенных правил.

При пересевах микроорганизмов стерильность достигается за счет того, что вся работа проводится вблизи пламени горелки. Бактериологические петли, используемые для посева микроорганизмов с твердых сред, прокалывают в пламени горелки, а стеклянную посуду и питательные среды предварительно стерилизуют в сушильных шкафах и в автоклавах соответственно.

Поверхность рабочего стола дезинфицируют как перед работой, так и после её окончания, протирая 3%-ным раствором хлорамина, лизола или 70%-ным раствором изопропилового или этилового спирта. Растворы данных спиртов могут применяться и для дезинфекции рук.

Подготовка помещения включает мокрую уборку и тщательную вентиляцию с последующим облучением ультрафиолетовым светом бактерицидных ламп. В зависимости от степени загрязненности воздуха для его стерилизации требуется облучение от 30 минут до нескольких часов. Ультрафиолетовые лучи опасны для глаз, поэтому при включенной бактерицидной лампе в помещении находиться нельзя.

При работе в микробиологической лаборатории обучающиеся должны соблюдать следующие правила:

1. Каждый студент должен работать на постоянном месте.
2. На рабочем месте не должно быть посторонних предметов (в том числе портфелей и сумок). Во время работы с горелкой на столе не должно быть также и тетрадей, которые понадобятся позже при микроскопии и зарисовке препаратов.
3. Вся работа выполняется в чистом халате. Длинные волосы должны быть подобраны, во избежание их попадания в пламя горелки.
4. На посуде, применяющейся для культивирования микроорганизмов (пробирках, колбах, чашках Петри, матрацах), должны быть сделаны надписи, содержащие родовое и видовое название культуры, дату засева, фамилию студента и номер группы.
5. Все предметы, использованные при работе с живыми культурами, должны быть обеззаражены либо обжиганием в пламени горелки, либо погружены в дезинфицирующий раствор (предметные и покровные стекла, пипетки, шпатели).
6. Все засеянные пробирки, чашки или колбы помещаются в термостат или сдаются лаборанту.
7. Отработанный материал помещается в определенные емкости для их дальнейшего обеззараживания.
8. В лаборатории строго запрещается курение и прием пищи.
9. В конце занятий каждый студент должен привести в порядок рабочее место.

Лабораторное занятие №1.

***«Изучение устройства микроскопа и овладение техникой микроскопирования.
Приготовление препаратов различных культур микроорганизмов в живом и
окрашенном виде».***

Цель работы: 1) Изучить устройство светового биологического микроскопа и освоить правила работы с ним.

2) Научиться готовить препараты различных культур микроорганизмов в живом и окрашенном виде.

Оборудование, материалы: микроскоп; готовые микропрепараты, предметное стекло, бактериологическая петля, покровное стекло, препаровальные иглы, пипетка, горелка, этиловый спирт, анилиновые красители

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

Схема светового биологического микроскопа представлена на рис. 1.

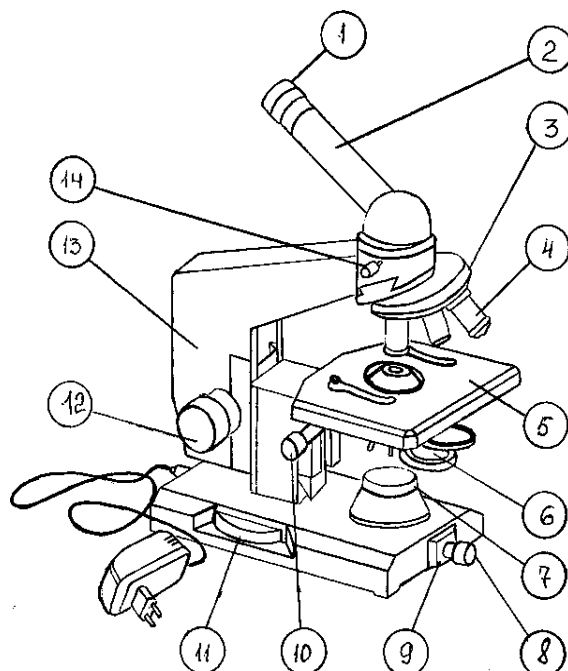


Рис. 1 Схема устройства светового биологического микроскопа

Задание 1

Укажите позиции рисунка

1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	

Задание 2

Изучите правила работы с микроскопом

1. На рабочем столе микроскоп ставят тубусодержателем к себе на расстоянии 3...5 см от края стола;

2. Включают микроскоп в сеть и устанавливают правильное освещение;
3. На предметный столик помещают исследуемый препарат и закрепляют его клеммами;
4. Под тубус помещают нужный объектив и с помощью макро и микровинтов устанавливают фокусное расстояние. Так, при работе с иммерсионными объективами на препарат предварительно наносят каплю иммерсионного масла и осторожно опускают тубусодержатель макровинтом до соприкосновения со стеклом. Затем, внимательно смотря в окуляр, очень медленно поднимают тубусодержатель, вращая его против часовой стрелки, до тех пор, пока не увидят изображение. Точную наводку объектива на фокус производят микрометрическим винтом. При работе с сухими объективами препарат вначале рассматривают с объективом х8. Поднимая с помощью макровинта тубусодержатель и внимательно смотря в окуляр, устанавливают фокусное расстояние (около 9 мм) и добиваются четкости изображения, используя микрометрический винт. Далее, двигая предметный столик или предметное стекло, устанавливают в центр поля тот участок препарата, в котором лучше всего виден изучаемый объект. Затем, вращая револьверное устройство вокруг своей оси, под тубус помещают объектив на х20 или х40. При этом под тубус не должен попасть объектив х90. В револьверном устройстве объективы располагаются таким образом, что если найдено изображение с объективом х8, то при рассмотрении препарата с объективами большего увеличения нужно слегка подрегулировать четкость изображения с помощью макро- и микрометрических винтов;
5. Во время микроскопирования необходимо держать оба глаза открытыми и пользоваться ими попеременно;
6. После окончания работы следует убрать препарат с предметного столика, опустить вниз конденсор, поставить под тубус объектив х8, удалить мягкой тканью или марлей, смоченной в спирте, иммерсионное масло с фронтальной линзы объектива х90, под объектив положить марлевую салфетку, опустить тубусодержатель.

Задание 3

Рассмотрите под микроскопом срезы зерна пшеницы и выполните рисунок среза.



Задание 4

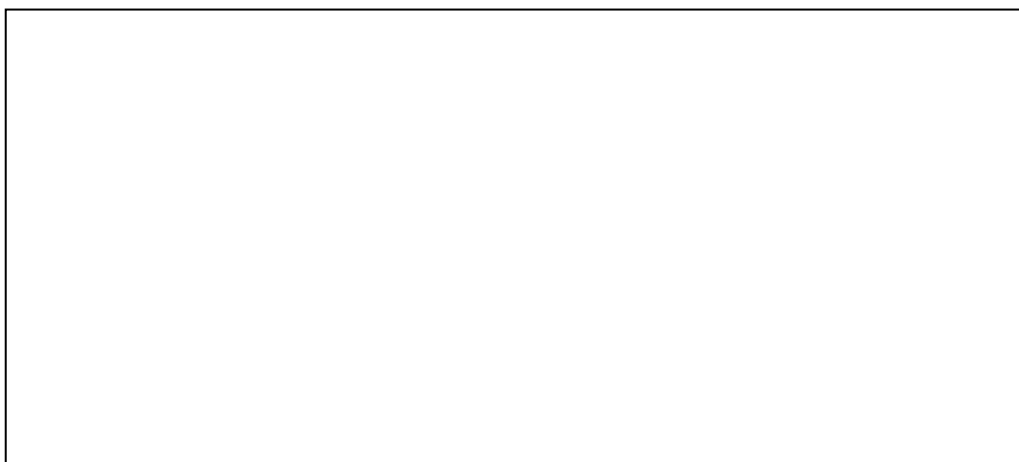
Приготовить препарат «раздавленная капля» неокрашенный (нативный)

На предметное стекло нанесите бактериологической петлей каплю водопроводной воды, внесите в нее немного исследуемых микроорганизмов, размешайте. Покровное стекло поставьте на ребро у края капли, постепенно опустите на нее. Излишек выступившей жидкости удалите фильтровальной бумагой.

Выращенные на плотной среде микроорганизмы перенесите в каплю жидкости с помощью бактериологической петли, микроскопические грибы – двумя препаровальными иглами. Культуры, выращенные в жидкой среде, поместите на предметное стекло стерильной пипеткой без предварительного нанесения капли воды.

Препарат позволяет установить форму клетки преимущественно крупных микроорганизмов, их размеры, подвижность.

Бактерии, дрожжи, микроскопируйте с объективом 40х, грибы – с объективами 8х, 40х. Зарисуйте препарат. Отработанные препараты живых микроорганизмов помещают в сосуд с дезинфицирующим раствором для обезвреживания.



Задание 5

Приготовить препарат в окрашенном виде из различных Культур микроорганизмов

Приготовление окрашенных фиксированных препаратов состоит из следующих этапов:

1. Приготовление мазка. На середину чистого предметного стекла наносят маленькую каплю воды, в неё вводят немного бактерий, взятых с плотной питательной среды кончиком стерильной бактериологической иглы, и тщательно перемешивают; полученную слабомутную бактериальную суспензию равномерно распределяют (размазывают) тонким слоем по поверхности предметного стекла на площади 2-3 см².

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

3. Фиксация мазка. Охлаждённый мазок фиксируют в пламени горелки: стекло с мазком, обращённым кверху, проводят 3-4 раза через пламя. При этом микробы погибают, клетки прикрепляются к стеклу и улучшается их окрашиваемость.

Возможна также фиксация химическим путём (этиловым, метиловым спиртом, смесью равных объёмов спирта с эфиром и др.)

Фиксированные препараты можно микроскопировать только после окраски специальными красителями.

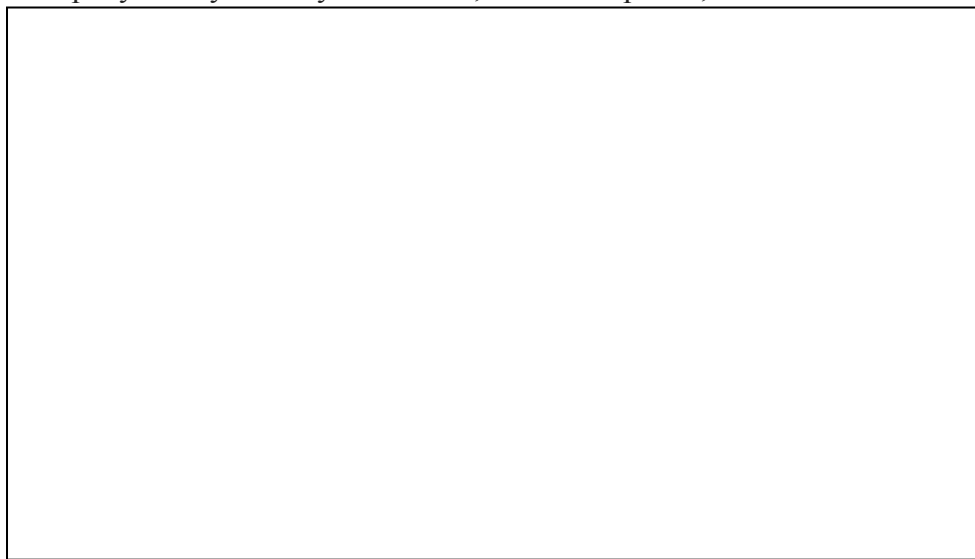
4. Окрашивание мазка. Различают простые и дифференциальные способы окраски микроорганизмов.

Для окраски микроорганизмов используют анилиновые красители. Наибольшее применение имеют основные краски - метиленовый синий, основной фуксин, генциановый фиолетовый и др.

При простой окраске используют один краситель, прокрашивают всю клетку. На охлаждённый мазок наносят 1-2 капли метиленового синего на 3-5 минут, затем смывают

водой до тех пор, пока промывная вода не станет прозрачной. Промытый мазок высушивают на воздухе или осушают фильтровальной бумагой.

5. Микроскопирование. На сухой препарат наносят каплю иммерсионного масла и микроскопируют с объективом 90х. Формы и расположение микроорганизмов необходимо зарисовать. Под рисунком указать увеличение, способ окраски, объект исследования.



Вывод: _____

Оценка выполнения лабораторной работы: _____

Лабораторное занятие № 2.

«Приготовление питательных сред. Освоение техники посева и пересева».

Цель: 1) освоить основные методики приготовления искусственных питательных сред, наиболее широко применяемых в лабораториях. 2) Освоить технику посева и пересева

Оборудование и материалы: сухая смесь (пептонно-агарная среда), водная баня, электронные весы, чашки Петри.

Изучить характеристику искусственных питательных сред для бактерий

Искусственные среды разделяют на животные [например, мясопептонный агар (МПА) или мясопептонный бульон (МПБ)] и растительные (например, настои сена и соломы, отвары злаков, дрожжей или фруктов, пивное сусло и др.). Естественные среды для выращивания бактерий Естественные питательные среды могут содержать компоненты животного (например, кровь, сыворотка, жёлчь) или растительного (например, кусочки овощей и фруктов) происхождения. По назначению выделяют консервирующие среды (для первичного посева и транспортировки), среды обогащения (для накопления определённой группы бактерий), среды для культивирования {универсальные простые, сложные специальные и для токсинообразования), среды для выделения и накопления (консервирующие, обогащения и селективные) и среды для идентификации (дифференциальные и селективно-дифференциальные). Классификации питательных сред по загрязнённости материала. Если материал слабо загрязнён посторонней микрофлорой, то для выделения чистых культур применяют простые (по составу) среды. При обильной контаминации сапрофитами используют специальные или селективные (для отдельных видов), селективные (только для отдельных бактерий), дифференциально-диагностические (для облегчения идентификации) среды.

Агар-агар получают из некоторых морских водорослей путем экстракции водой при кипячении. Образующаяся масса представляет собой студень. Высококачественный агар-агар изготавливают из красных морских водорослей. По составу это сложное органическое соединение, в котором преобладают полисахариды (70 - 80 %). Готовый агар-агар слабозеленого цвета, имеет вид шнуров, пластинок или порошка. Плавится при температуре примерно 100 °С, застывает при 40 °С. При добавлении к среде придает ей плотность.

Пептон - продукт неполного распада белков, происходящего под действием ферментов в кислой среде. По составу это смесь полипептидов и некоторых аминокислот. Содержит вещества, необходимые для жизни многих микроорганизмов. Получают пептон из рубца крупного и мелкого рогатого скота. Препарат легко растворяется в воде, при нагревании не свертывается, не выпадает в осадок при добавлении в раствор солей.

Желатин - животный клей, состоящий из белка. Получают его путем варки хрящей, костей и сухожилий. Внешне он напоминает листочки светло-коричневого цвета, не имеет запаха и вкуса. Плавится при температуре 32 - 34 °С, застывает при 16 °С.

Задание 2

*Приготовить пептонно-агарную питательную среду.
Дать описание мясопептонного агара и этапов его приготовления.*

[illegible]

[illegible]

Задание 3

Освоить технику посева и пересева

При посеве и пересеве необходимо соблюдать следующие приёмы:

1. В левую руку берут две пробирки – одну со стерильной средой, другую – с культурой и держат в наклонном положении. В правой руке большим и указательным пальцем держат бактериальную петлю и стерилизуют в пламени горелки.
2. Вынимают ватные пробки из обеих пробирок, прижимают их к ладони мизинцем и безымянными пальцами правой руки и обжигают края пробирок. Следят за тем, чтобы пробки не касались посторонних предметов.
3. Петлю вводят в пробирку с пересеваемой микробной культурой. Осторожно, не касаясь стенок, отбирают каплю жидкой культуры. Если производят пересев со скошенной питательной среды, то для охлаждения петли вначале следует прикоснуться к поверхности ПС или внутренней стенки пробирки, где нет культуры, после чего берут небольшое количество микробной массы с плотной среды на кольцо петли.
4. Вводят петлю с материалом в пробирку со стерильной жидкой средой, стараясь не задевать стенок пробирки. При посеве на скошенные питательные среды петлю с клетками микроорганизмов опускают почти до дна, где скапливается небольшое количество конденсационной воды. Слегка касаясь кольцом петли поверхности плотной среды, проводят от дна вверх штрих.
5. Петлю вынимают, обжигают края пробирок и внутренние концы пробок, после чего пробирки закрывают.
6. Петлю вновь прокаливают в пламени горелки и ставят в штатив или стакан вверх кольцом петли.
7. На пробирке делают надпись: название культуры и дату посева.

Пересев культур микроорганизмов в жидкую среду. Пересев в жидкую среду можно производить петлей или пипеткой. Обе пробирки держат в слегка наклонном положении, чтобы не замочить ватные пробки. Петлей или пипеткой отбирают материал из пробирки с выросшей культурой и переносят в пробирку со стерильной средой. При внесении клеток, взятых петлей из плотной среды, материал тщательно растирают по стенке пробирки у верхнего края жидкой стерильной среды, все время, смывая его средой. Засеянные пробирки закрывают, подписывают, датируют и ставят на инкубирование.

Пересев на плотные среды в чашки Петри. Пересев в чашки Петри проводится глубинным и поверхностным способами.

Поверхностный способ посева: плотную стерильную питательную среду расплавляют на кипящей водяной бане и, соблюдая правила стерильности, разливают ровным слоем толщиной 3-5 мм в стерильные чашки Петри. Оставляют до полного застывания среды. На

поверхность среды вносят инокулят и стеклянным шпателем равномерно распределяют его по поверхности (посев газоном) или петлей в виде параллельных или зигзагообразных штрихов.

Глубинный способ посева: на дно стерильной чашки Петри вносят петлей или пипеткой определённый объём посевного материала. Обжигают края пробирки или колбы в пламени горелки и заливают расплавленной охлаждённой агаризованной питательной средой, соблюдая правила асептики. Распределяют равномерно посевной материал в питательной среде, для чего круговыми движениями перемещают чашку Петри по поверхности стола. Оставляют до полного застывания.

Посев уколом на плотные среды. Такой посев производят в пробирки с несокошенной агаризованной питательной средой. При посеве пробирки держат вверх дном.

Задание 4

Все посе́вы, выполненные описанными способами, подписать, поместить в термостат перевернутыми вверх дном (для посевов в чашки Петри) для выращивания микроорганизмов при температуре, благоприятной для их роста.

Вывод: _____

Оценка выполнения лабораторной работы: _____

Лабораторное занятие №3.

«Определение содержания головни, спорыньи и фузариоза в зерне пшеницы».

Цель работы: 1) определить содержание головни, спорыньи и фузариоза в зерне пшеницы
Оборудование,
материалы: _____

Задание 1

Изучить методику определения содержания фузариозных зерен согласно ГОСТ 31646-2012 «Зерновые культуры. Метод определения содержания фузариозных зерен». Запишите основные внешние отличительные признаки фузариозных зерен пшеницы в таблицу.

	Внешние признаки зерна пшеницы
--	--------------------------------

Наименование показателя	Фузариозное зерно	Обесцеченное нефузариозное зерно (III степени)	Розовоокрашенное нефузариозное зерно

Расчет содержания фузариозных зерен в пшенице

Задание 2

Изучить методику содержания головневых зерен согласно ГОСТ 304883-97 «Зерно. Методы определения общего и фракционного содержания сорной и зерновой примесей; содержания мелких зерен и крупности; содержания зерен пшеницы, поврежденных клопом-черепашкой; содержания металломагнитной примеси».

Расчет содержания головневых зерен в пшенице

Выполнить рисунок «Цикл развития пыльной головки пшеницы»

Задание 3

Изучить методику и описать методику содержания спорыньи согласно ГОСТ 13496.5-2018 Комбикорма. Метод определения спорыньи

Расчет содержания спорыньи

Вывод:

Оценка выполнения лабораторной работы:

Лабораторное занятие №4

«Анализ смывов с рук персонала, оборудования с целью контроля чистоты».

Цель работы: Освоение методики проведения смыслов с рук, инвентаря, оборудования.

Оборудование и материалы: приборы, реактивы, посуда термостат, чашки Петри, ватные тампоны, пипетка, изотонический раствор хлорида натрия, молочно-солевой агар, пробирки, среда Кеслера.

Основным видом лабораторного контроля за соблюдением санитарного режима на предприятиях пищевой промышленности является бактериологическое исследование

смылов с рук, одежды, инвентаря, оборудования, с целью установления степени их бактериального обсеменения и загрязнения БГКП.

Смывы с оборудования и инвентаря производят перед началом работы либо после санитарной обработки в санитарные дни.

Смывы с рук производят перед началом работы, после пользования туалетом.

Практическая часть.

Методика выполнения работы

Стерильные тампоны на стеклянных или металлических палочках

увлажняют физиологическим раствором, разлитым по 2 мл в стерильные пробирки непосредственно перед взятием смыва. Смывы с крупного оборудования и инвентаря берут с поверхности 100 см² в разных местах исследуемого предмета. Для ограничения поверхности используют шаблон.

При взятии смывов с рук протирают тампоном ладони обеих рук, проводя не менее 5 раз по одной ладони и пальцам, затем протирают участки между пальцами, ногти и под ногтями.

Смывы исследуют на обнаружение бактерий группы кишечной палочки и определение наличия коагулозоположительных стафилококков.

1. Определение коагулозоположительных стафилококков.

Для этого производят посев непосредственно тампоном на чашки Петри с молочно-солевым агаром.

2. Выявление БГКП.

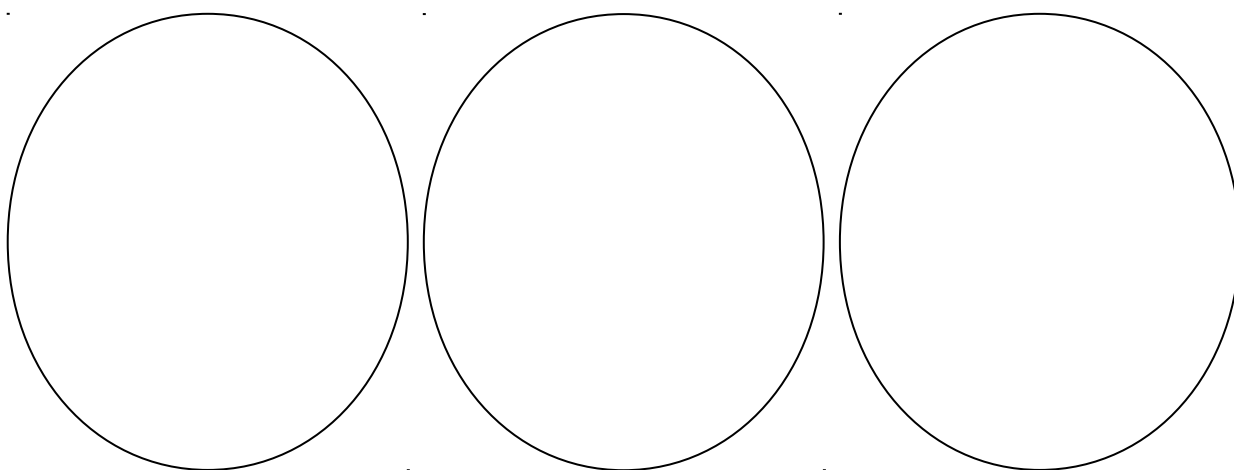
Для этого посев производят в среду накопления, для чего тампон погружают в среду Кеслера, разлитую в пробирки по 5-10 мл.

Чашки Петри и пробирки с исследуемым материалом помещают в термостат при температуре 37°C на 48 часов. По истечении этого времени подсчитывают колонии микроорганизмов и наблюдают за изменением среды Кеслера. БГКП и коагулозоположительные стафилококки должны отсутствовать в смывах с контролируемых объектов.

Задание 1

Написать отчет о проделанной работе.

[illegible]



Вывод: _____

Оценка выполнения лабораторной работы: _____

Литература

1. Ассонов Н.Р. микробиология.- М.: Колос-Пресс, 2015
2. Гордеева Н.Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии

3. Жарикова Г.Г. Микробиология продовольственных товаров. Санитария и гигиена: учебник для вузов. – М.: ИЦ «Академия», 2005.-304с.
4. Никитина Е.В. Микробиология: учебник. – СПб.: ГИОРД, 2008.-368с.
5. Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов. СанПиН 2.3.2 560-96