

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ  
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

**Б3.В.Од.5 Санитарная микробиология**

**Направление подготовки (специальность) 111900.62 «Ветеринарно-санитарная экспертиза»**

**Профиль образовательной программы «Ветеринарно-санитарная экспертиза»**

**Форма обучения заочная**

## СОДЕРЖАНИЕ

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1.</b>  | <b>Конспект лекций.....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>Лекция №1 Санитарно-показательные микроорганизмы (СПМО).....</b>                         | <b>3</b>  |
| <b>1.2</b> | <b>Лекция №2 Санитарно-микробиологическое исследование мяса .....</b>                       | <b>7</b>  |
| <b>1.3</b> | <b>Лекция №3 Санитарно-микробиологическое исследование молока .....</b>                     | <b>11</b> |
| <b>2.</b>  | <b>Методические указания по выполнению лабораторных работ.....</b>                          | <b>16</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Лабораторная работа №1 Определение санитарно-показательных<br/>микроорганизмов .....</b> | <b>16</b> |
| <b>2.2</b> | <b>Лабораторная работа №2 Микробиологический анализ мяса .....</b>                          | <b>17</b> |
| <b>2.3</b> | <b>Лабораторная работа №3 Микробиологический анализ молока .....</b>                        | <b>18</b> |
| <b>3.</b>  | <b>Методические указания по проведению практических занятий.....</b>                        | <b>20</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Практическое занятие №1 Микробиологический анализ кисло-молочных<br/>продуктов.....</b>  | <b>20</b> |

# **1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ**

**Лекция №1 (2 часа)**

**Тема: «Санитарно-показательные микроорганизмы (СПМО)»**

## **1. Вопросы лекции:**

1. Общая характеристика СПМО
2. Первая, вторая и третья группы СПМО.

## **2. Краткое содержание вопросов:**

1. Общая характеристика СПМО.

Основным источником распространения большинства инфекционных заболеваний являются сами люди, а также теплокровные животные. Наиболее массивное выделение ими микроорганизмов в окружающую среду происходит воздушно-капельным и фекальным путями.

Санитарно-микробиологическое исследование объектов окружающей среды обязано решить вопрос о наличии или отсутствии в них опасных для человека микроорганизмов. Непосредственное обнаружение возбудителя инфекционных болезней в объектах окружающей среды (несмотря на то что в настоящее время разработаны методы прямого, ускоренного и количественного их определения) имеет целый ряд трудностей.

Во-первых, патогенные микроорганизмы находятся в окружающей среде постоянно. Сравнительно легко их можно обнаружить в период эпидемий, но очень трудно в межэпидемические периоды. Основная же деятельность санитарных микробиологов направлена на предупреждение возникновения эпидемий, и поэтому вся работа ведется в межэпидемические периоды.

Во-вторых, количество патогенных микроорганизмов, попавших в окружающую среду, значительно уступает непатогенным и распространение их в загрязненных объектах неравномерно. Трудности возникают и при выделении патогенных микробов при посевах на питательные среды, даже ингибиторные, поскольку они неизбежно страдают от конкуренции сапротифитной микрофлоры. Отрицательные результаты индикации патогенных микроорганизмов в объектах окружающей среды еще не говорят с достоверностью об их отсутствии. Поэтому приходится оценивать различные объекты косвенным путем, устанавливая факт загрязнения их выделениями человека или теплокровных животных. И чем обильнее это загрязнение, тем более вероятно попадание в объект патогенных микробов.

Сообщающиеся с внешним миром полости тела людей и животных обильно заселены нормальной микрофлорой довольно постоянной по качественному составу и сравнительно мало изменяющейся при инфекционных заболеваниях.

Для многих видов микроорганизмов (обитателей тела здорового человека) полость рта или кишечник являются биотопами — единственной средой обитания. Поэтому обнаружение таких микробов вне организма свидетельствует о загрязнении соответствующими выделениями. Находя в исследуемом материале представителей микрофлоры полости рта, мы вправе думать о попадании слизи из дыхательных путей, в которой могут содержаться и возбудители скарлатины, туберкулеза и др., а, обнаруживая нормальных обитателей кишечника, мы можем сделать заключение о наличии фекального загрязнения и возможной опасности присутствия брюшнотифозных, дизентерийных палочек, возбудителей кишечных инфекций.

Выделяемые в этих случаях микробы служат показателями санитарного неблагополучия, потенциальной опасности исследуемых объектов, и поэтому названы «санитарно-показательными». Однако не все микробы, входящие в состав нормальной флоры тела человека или животных, могут быть признаны таковыми.

На основании многочисленных исследований были сформулированы требования, которым должны отвечать санитарно-показательные микроорганизмы:

1. Они должны постоянно содержаться в выделениях человека и теплокровных животных и поступать в окружающую среду в больших количествах.
2. Они не должны иметь другого природного резервуара, кроме организма человека и животных.
3. После выделения в окружающую среду они должны сохранять жизнеспособность в течение сроков, близких к срокам выживания патогенных микробов, выводимых из организма теми же путями.
4. Они не должны размножаться в окружающей среде.
5. Они не должны сколько-нибудь значительно изменять свои биологические свойства в окружающей среде.
6. Они должны быть достаточно типичными, с тем, чтобы их дифференциальная диагностика осуществлялась без особого труда.
7. Индикация, идентификация и количественный учет должны производиться современными, простыми, легкодоступными и экономичными микробиологическими методами.

Поскольку два первых признака считались решающими, то длительное время кишечную палочку признавали индикатором фекального загрязнения, а зеленящийся стрептококк — показателем воздушно-капельного загрязнения.

## 2. Первая, вторая и третья группы СПМО.

**БГКП.** В действующих нормативных документах по контролю за санитарно-бактериологическими показателями воды, пищевых продуктов, почвы предусмотрен учёт БГКП. Следует отметить, что понятие БГКП - утилитарное (санитарно-бактериологическое и экологическое), но не таксономическое. Эта группа представлена микроорганизмами родов *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, экологические особенности которых определяют их индикаторную значимость.

Группа кишечных палочек - грамотрицательные, не образующие спор, короткие палочки, сбраживающие глюкозу и лактозу с образованием кислоты и газа при температуре  $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$  в течение 24-48 ч, не обладающие оксидазной активностью. В некоторых официальных документах (по воде, почве, пищевым продуктам) имеются особенности формулировки БГКП, не имеющие, однако, принципиального значения.

**Эшерихии.** Род *Escherichia*, включающий типовой вид *E. coli* - показатель свежего фекального загрязнения, возможная причина пищевых токсикоинфекций. Для идентификации используют биохимические тесты, учитывая способность к ферментации лактозы при температуре  $44\pm0,5^{\circ}\text{C}$  и отсутствие роста на цитратсодержащих средах. Представителей рода, находящихся в воде, трактуют как термотolerантные колiformные бактерии, в лечебных грязях - как фекальные колiformные бактерии, в пищевых продуктах - как *E. coli*.

**Цитробактерии.** Этиологическая роль бактерий рода *Citrobacter* доказана при эпидемических вспышках, клинически протекающих с явлениями диспепсии, гастроэнтероколита, пищевых токсикоинфекцией.

Кишечная палочка не является идеальным СПМО. К недостаткам кишечной палочки как СПМО относятся следующие:

- обилие аналогов во внешней среде;
- изменчивость во внешней среде;
- недостаточная устойчивость к неблагоприятным воздействиям;
- недостаточно длительное выживание в продуктах по сравнению с шигеллами Зоне (возбудитель дизентерии), сальмонеллами, энтеровирусами;
- способность к размножению в воде;
- нечёткий индикатор даже в отношении присутствия сальмонелл.

Все эти факты обусловили поиск замены кишечной палочки.

**Энтерококки.** В 1910 г. на роль СПМО предложены энтерококки.

(*Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*).

Преимущества энтерококка как СПМО.

– Постоянно находится в кишечнике человека и постоянно выделяется во внешнюю среду. При этом *E. faecalis* в основном обитает в кишечнике человека, поэтому обнаружение его свидетельствует о загрязнении фекалиями людей. В меньшей степени у человека встречается *E. faecium*. Последний в основном обнаруживается в кишечнике животных, хотя сравнительно редко также отмечается и *E. faecalis*.

– Не способен размножаться во внешней среде, в основном размножается *E. faecium*, но он имеет меньшее эпидемиологическое значение.

– Не изменяет своих свойств во внешней среде.

– Не имеет аналогов во внешней среде.

– Устойчив к неблагоприятным воздействиям внешней среды.

– Для индикации энтерококков разработаны высокоселективные среды.

Энтерококкометрия узаконена в международном стандарте на воду, как показатель свежего фекального загрязнения. При обнаружении в воде атипичных кишечных палочек, присутствие энтерококков становится главным показателем свежего фекального загрязнения. К сожалению, в СанПиН 2.1.4.1074-01 на питьевую воду определение энтерококка не предусмотрено.

Энтерококкометрия молока, мясных изделий (котлет) проводится в целях выяснения эффективности их термической обработки.

Бактерии рода *Proteus* встречаются в 98% случаев в выделениях кишечника человека и животных, из них в 82% случаев - *P. mirabilis*. Обнаружение протея в воде и продуктах указывает на загрязнение объектов разлагающимися субстратами и свидетельствует о крайнем санитарном неблагополучии. При обнаружении протея в пищевых продуктах их бракуют, а воду не разрешают употреблять для питья. Протеометрия воды официально признана в США.

**Клостридии.** *Clostridium perfringens* - другой СПМО со своими достоинствами и недостатками:

– непостоянно обнаруживается в кишечнике человека;

– длительно сохраняется во внешней среде за счёт спорообразования, поэтому не свидетельствует о свежем фекальном загрязнении;

– *C. perfringens* может служить косвенным показателем наличия в воде энтеровирусов;

– для прорастания спор клостридиям необходим температурный шок (прогревание при температуре +75 °C в течение 15-20 мин). В МУК 1.2.1018-01 по санитарно-микробиологическому анализу питьевой воды температурная проба воды является обязательной.

Определение титра этого СПМО рекомендовано при текущем санитарном надзоре за состоянием территории. Тесты на обнаружение сульфитредуцирующих клостридий в воде предусматривают стандарты России, США и других странах. Определение *C. perfringens* проводят в воде открытых водоёмов, почве, лечебных грязях, мясных продуктах.

**Термофилы.** Это целая группа СПМО, в основном споровых, растущих при температуре 55-60 °C. Обитают во внешней среде и служат показателем загрязнения навозом и компостом. При гниении навоза или компоста температура поднимается более 60°C, и термофилы бурно размножаются. О степени загрязнения судят по количеству термофилов. В России их определяют при исследовании почвы, а также в консервах как индикатор термической обработки, особенно при хранении в условиях жаркого климата.

**Бактериофаги.** В качестве СПМО используют бактериофаги кишечной палочки - коли-фаги, фаги сальмонелл и шигелл. Их обнаруживают там, где есть соответствующие

бактерии, к которым эти фаги адаптированы. Фаги выживают во внешней среде более 9 мес.

**Сальмонеллы.** В 30-х г. XX века У. Вильсон и Э. Блер предложили сальмонелл в качестве СПМО.

Преимущества сальмонелл как СПМО:

1. Сальмонеллы - наиболее распространенные микроорганизмы, вызывающие острые кишечные заболевания (ОКЗ), могут служить индикатором других ОКЗ с аналогичными патогенезом и эпидемиологией. Количество носителей сальмонелл среди людей и животных значительное. Их довольно часто обнаруживают даже в сточных водах.

2. Поступают во внешнюю среду только с фекалиями человека и животных.

Недостатки:

1. Размножаются в почве при наличии в ней большого количества органических веществ, однако, могут размножаться даже в чистой воде.

При определении сальмонелл в воде следует вычислять не только процент положительных обнаружений, но и НВЧ. По этому показателю можно оценить эпидемиологическую ситуацию.

**Бактероиды.** Бактероиды обнаруживают в 1 г фекалий в высоких концентрациях. Это грамотрицательные палочки, строгие анаэробы, подвижные и неподвижные, образуют мелкие колонии, требовательны к питательным средам. Они - постоянные обитатели кишечника человека, их количество значительно превышает все другие СПМО. Преимущества:

- Бактероидов много, они в больших количествах выделяются во внешнюю среду.
- Не имеют двойников.
- Не размножаются во внешней среде.
- Отмирают во внешней среде быстрее, чем кишечные палочки, поэтому служат показателями свежего фекального загрязнения.

Однако имеются определённые трудности с их выращиванием, так как необходимы специальные питательные среды и особые условия культивирования.

**Синегнойная палочка.** Недостатки синегнойной палочки как СПМО.

- Обнаруживается в фекалиях здоровых людей в 11%, а у животных в 7% (т.е. непостоянно).
- Способна размножаться во внешней среде.
- Методы индикации просты, но только в отношении пигментных форм, а во внешней среде преобладают беспигментные формы, которые распознать трудно.
- Обнаруживается в 90% случаев в сточных водах, больничных палатах. Наличие синегнойной палочки свидетельствует о неблагополучном санитарном состоянии лечебного учреждения.

Роль её выросла в связи с распространением антибиотикорезистентных штаммов и появлением большого количества носителей.

**Грибы рода *Candida*** постоянно присутствуют в организме человека: в фекалиях в 10-90% случаев, в слизи верхних дыхательных путей - в 15-50%, на коже - в 1-100%. Они обнаруживаются везде, где есть сахаросодержащие вещества. Первоисточником в природе служат человек и животные. Грибы рода *Candida* очень устойчивы к неблагоприятным воздействиям внешней среды, даже более, чем патогенные бактерии. Их можно использовать в качестве индикаторов эффективности дезинфекции.

**Вторая группа СПМО.**

Представителей второй группы СПМО определяют в воздухе, молочных продуктах, воде. К ним относится зеленящий стрептококк (*S. salivarius*). У него есть двойники, такие как *S. lactis*, *S. bovis*, *S. equinus*, *S. cremoris*. Но эти двойники редко обна-

руживаются в жилых помещениях. Зеленящими могут быть и энтерококки, но они сами являются СПМО.

Другой санитарно-показательный стрептококк - гемолитический стрептококк. Его обнаруживают в 80% у людей, страдающих в основном воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей. Он обладает гемолитическими свойствами.

Показателем санитарного неблагополучия считается и золотистый стафилококк. Именно этот вид стафилококка связан с присутствием людей и некоторых животных. В среднем у здоровых людей золотистый стафилококк обнаруживают в 30% случаев, а у медицинского персонала до 96%. Этот вид стафилококка отличается длительностью выживания и устойчивостью во внешней среде. Он может быть косвенным индикатором загрязнения воздуха вирусами. Использование золотистого стафилококка, как наиболее информативного СПМО, рекомендовано при исследовании воздуха жилых помещений, жилых отсеков космических кораблей, подводных лодок, лечебно-профилактических учреждений.

На роль СПМО выдвигаются также антибиотикорезистентные стафилококки и микрококки, 5-6-кратное превышение указанных СПМО в воздухе больничных помещений по сравнению с воздухом небольничных помещений следует оценивать как плохой прогностический признак.

### **Третья группа СПМО**

**Бделловибрионы** предложены в качестве СПМО в 1962 г. Это аэробные грамотрицательные палочки, размером 0,25-1,2 мкм, подвижные, имеют жгутики, по отношению к другим бактериям - хищники, поражающие только грамотрицательные палочки. На одном из полюсов бделловибрионов есть та, где скапливаются экзотоксин и липополитический фермент, который растворяет клеточную стенку бактерий. Отличают их друг от друга по литической активности: одни лизируют только псевдомонады, а другие только юнады. Бделловибрионы применяют для биологической очистки воды, однако выпускают в воду плавательных бассейнов), используют и как СПМО по загрязнению воды. В местах сброса сточных вод количество бделловибрионов достигает 3000 КОЕ/см<sup>3</sup>, в отдалении от сброса - 10 КОЕ/см<sup>3</sup>.

Определяют бделловибрионы по методу Грация, но для постановки пробы им индикаторный штамм *E. coli* K-12. Количество их выражают в бляшкообразующих единицах (БОЕ/см<sup>3</sup>).

**Аэромонады.** В 1969 г. предложено использовать в качестве СПМО ромонады. Они в больших количествах содержатся в сточных водах обладают большой энергией размножения. Служат показателем нагрузки сточных вод на водоём и имеют такое же значение, как ОМЧ. При большой концентрации аэромуна в воде может наступить пищевое отравление.

## **Лекция №2 (2 часа)**

### **Тема: «Санитарно-микробиологическое исследование мяса»**

#### **1. Вопросы лекции:**

1. Микрофлора парного, охлаждённого, замороженного мяса.
2. Пороки мяса микробного происхождения.
3. Правила отбора проб и подготовка к исследованию.

#### **2. Краткое содержание вопросов:**

1. Микрофлора парного, охлаждённого, замороженного мяса. Микроорганизмы, контактирующие мясо на различных стадиях технологического процесса, делятся на четыре группы:

- патогенные (возбудители ящура, туберкулеза, лептоспироза, листериоза,

бактериальных токсикоинфекций и интоксикаций, микотоксикозов, энтеровирусных заболеваний);

- условно-патогенные;
- санитарно-показательные (кишечная палочка, стрептококки группы О);
- сапрофиты. Сапрофитная микрофлора мяса включает около 30 типов различных бактерий.

Мясо животных может быть обсеменено двумя путями. В живом организме всегда находятся микроорганизмы, которые при определенных условиях могут проникать в кровь и в мускулатуру. Этот путь называется **эндогенным**, то есть происходящим при жизни животного. Посмертное обсеменение туши, связанное с попаданием микроорганизмов из окружающей среды, называют **экзогенным**.

#### **Эндогенный путь**

#### **Экзогенный путь**

Мясо и мясопродукты являются хорошей питательной средой для развития микроорганизмов. Поэтому в целях сохранения качества мяса и мясопродуктов их подвергают посолу, холодильному хранению и другим видам консервирования.

На холодильниках и мясокомбинатах мясо и мясопродукты хранят при низких температурах в охлажденном и замороженном виде.

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

К концу охлаждения в глубоких слоях мяса температура должна достигать 0-4°C. Следовательно, на охлажденном мясе в процессе хранения могут развиваться только психрофильные микроорганизмы.

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

Размножение микроорганизмов в мясе при низких температурах проходит несколько фаз (лаг-фазу, логарифмическую фазу, максимальную стационарную фазу и фазу отмирания). В начальный период хранения охлажденного мяса психрофильные микроорганизмы, находясь в лаг-фазе (фазе задержки роста), некоторое время не размножаются или их размножение происходит в очень незначительной степени. При резком и быстром охлаждении, более низкой температуре и влажности лаг-фаза увеличивается. При соблюдении установленного температурно-влажностного режима (относительная влажность 85-90%, температура воздуха от -1 до 1°C) на охлажденном мясе, полученном в результате убоя здоровых, отдохнувших животных с соблюдением всех основных санитарных правил и имеющем обычно незначительную микробную обсемененность, размножение микроорганизмов задерживается на 3-5 дней и более. При высокой степени загрязнения мяса микроорганизмами фаза задержки роста микроорганизмов сокращается до 1 сут., а иногда составляет всего несколько часов.

По истечении лаг-фазы начинают усиленно размножаться психрофильные микроорганизмы (логарифмическая фаза) и их число резко возрастает. На охлажденном мясе в аэробных условиях хранения размножаются неспорообразующие грамотрицательные бактерии рода псевдомонас и ахромобактер, а также плесневые грибы и аэробные дрожжи, преимущественно родов родоторула (*Rodotorula*) и торулопсис.

В условиях пониженной влажности и более низких температур, наблюдается активный рост плесневых грибов и аэробных дрожжей.

При активном размножении микроорганизмов в результате их жизнедеятельности в конце стационарной фазы может наступить порча охлажденного мяса.

**Микрофлора мороженого мяса.** Во время замораживания мяса отмирает значительное количество микроорганизмов, содержащихся в охлажденном мясе. Губительно действуют высокая концентрация растворенных в продукте веществ и пониженная влажность, создающиеся в результате вымерзания воды, изменение содержащихся в клетках белков и механическое действие льда.

Микроорганизмы отмирают и в процессе его последующего хранения в замороженном состоянии. Чем ниже температура (-18...-20°C) и выше скорость замораживания, тем больше погибает микроорганизмов.

В процессе хранения мороженого мяса отмирание микроорганизмов, выживших при замораживании, замедляется. Полного отмирания микроорганизмов в мороженом мясе не происходит. Даже после длительного хранения мороженого мяса оно не становится стерильным и может содержать много живых сапрофитных микроорганизмов — возбудителей порчи, а иногда и патогенных бактерий. Большинство плесневых грибов и дрожжей на мороженом мясе при -18°C не погибают в течение 3 лет. **В соответствии с этим по действующей в нашей стране технологической инструкции мороженое мясо рекомендуется хранить при -12°C и ниже, что позволяет сохранять его практически неограниченное время без признаков порчи.**

## 2. Пороки мяса микробного происхождения.

На скорость размножения микроорганизмов, а следовательно, порчи мяса влияют температура, относительная влажность воздуха, а также степень первоначальной обсемененности мяса микроорганизмами.

1. Гниение мяса (распад белков). Этот вид порока вызывается действием как аэробных, так и анаэробных микроорганизмов и представляет собою многостадийный процесс разложения белковых и других азотсодержащих веществ. Многостадийность процесса обусловлена неодинаковой ферментативной активностью гнилостной микрофлоры по отношению к различным веществам, в результате чего появляющиеся при распаде белков аминокислоты при дезаминировании и декарбоксилировании образуют летучие жирные кислоты или амины, большинство из которых не только обладает дурным запахом, но и ядовиты.

Высокотоксичными для человека являются и образующиеся при гниении мяса птomainы (органические основания). Среди аэробов, наиболее эффективно разлагающих белки мяса, выделяют *B. ruosupaneum*, *B. mesentericus*, *B. subtilis*, стафилококки и стрептококки, а из анаэробов – *Cl. perfringens*, *Cl. sporogenes*, *Cl. putrificum* и других представителей рода. Образующиеся аминокислоты активно разлагают *B. faecalis*, *alcaligenes*, *B. aminoliticus*, *E. coli* и др. В процессах гниения мяса участвуют и плесневые грибы.

Подвергшееся этому виду порчи мясо в зависимости от органолептических, физико-химических и бактериологических показателей после проварки допускается на кормовые цели (в корм пушным зверям) или подвергается технической утилизации.

2. Закисание (кислотное брожение). Чаще всего этот вид порчи мяса наблюдается в мясных продуктах, богатых гликогеном, в том числе в печени, где он превращается в молочную кислоту. Мясо приобретает кислый вкус, бледно-серую окраску и мягкую консистенцию. Образующаяся кислота создает благоприятные условия для развития плесневых грибов, психрофильных лактобактерий, дрожжей. Продукты жизнедеятельности последних – NH<sub>3</sub> и азотистые основания, нейтрализуют среду и тем самым способствуют развитию гнилостных микроорганизмов.

3. Плесневение. Вызывается плесневыми грибами родов *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium* и др. Грибы плохо развиваются при  $-10^{\circ}\text{C}$  и ниже. С целью профилактики плесневения необходимо проводить дезинфекцию холодильных камер, способствующую уничтожению спор, а мясо рекомендуется хранить в замороженном виде при низкой влажности и при недостатке  $\text{O}_2$ .

4. Загар. Появляется в результате развития ферментативных процессов, иногда приводящих к тому, что мясо становится непригодным к употреблению. При этом в тканях накапливаются  $\text{H}_2\text{S}$ , масляная кислота и другие дурно пахнущие вещества. В связи с этим мясо приобретает дряблую консистенцию, а его цвет становится серовато-коричневым. Оценка пригодности такого мяса зависит от степени загара. С этой целью мясо в виде небольших кусков развешивают в холодильной камере с интенсивной циркуляцией воздуха и, если через 24 ч неприятный запах не исчезает, его считают непригодным в пищу.

5. Пигментация – это развитие на поверхности мяса бактерий, образующих пигменты. Мясо приобретает красный цвет при развитии *Serratia marcescens*, желтый – *Sarcina flava*, синий – *Pseudomonas aeruginosa*, зеленый – *Pseudomonas fluorescens*. Пигментированное мясо может употребляться в пищу при удалении с его поверхности пигментных пятен.

6. Свечение. Этот вид порчи вызывается фотобактериями (неспорообразующими Грам- и Грам+ палочками, кокками и вибрионами), попадающими в мясо с рыбы и рыбопродуктов при их совместном хранении. Фотобактерии не вызывают изменений мяса, так как используют энергию солнца, а не органических соединений, поэтому служат показателем свежести продукта – с появлением гнилостных микроорганизмов их жизнедеятельность обычно прекращается.

7. Ослизнение – процесс порчи мяса, связанный с развитием микроорганизмов, способных образовывать слизь: молочнокислых бактерий, дрожжей, микрококков. Причины порчи: недостаточное охлаждение туш, хранение при повышенной влажности и при температуре  $2-10^{\circ}\text{C}$ .

### 3. Правила отбора проб и подготовка к исследованию.

Проникновение бактерий в глубину мяса сопровождается снижением его качества. На этом основано бактериоскопическое исследование, позволяющее быстро установить степень его свежести (ГОСТ 23392-78). Количество бактерий и степень распада мышечной ткани определяют микроскопированием окрашенных по Граму мазков-отпечатков. Микроскопическое исследование мяса основано на определении количества бактерий в мазках-отпечатках и степени распада мышечной ткани.

Доброкачественность мяса определяют в сомнительных, спорных случаях оценки т.е. при первых признаках порчи (ослизнение, гнилостное разложение, загар и т.д.) При этом свежесть мяса устанавливают с помощью комплекса исследований — органолептических, биохимических и микроскопических.

**Отбор проб для определения свежести мяса.** От каждой туши или полутуши сомнительной свежести отбирают для исследования 3 образца массой не менее 200 г каждый целым куском из мышц бедра, лопатки и области 4-5-го шейных позвонков. В образцах кроме мышечной ткани должны быть сухожилия и жир. Образцы, взятые от одной туши, упаковывают в пергаментную бумагу (каждый отдельно), подписывают и отправляют в лабораторию с сопроводительным документом, в котором указывают дату, место взятия проб, вид животного, номер туши, причину и цель исследования, подпись отправителя. Микробиологическое исследование мяса проводят также во всех случаях, когда предполагается наличие возбудителей зооантропонозов или возбудителей пищевых токсикозов и токсикоинфекций.

Согласно Правилам ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясопродуктов предусмотрено проводить бактериологическое исследование мяса и мясопродуктов при подозрении на сибирскую

язву, рожу свиней, листериоз и другие инфекционные болезни в целях решения вопроса о возможности и порядке использования мяса и других продуктов убоя животных.

Микробиологическое исследование также проводят в следующих случаях:

1. при вынужденном убое животных независимо от причины убоя и принадлежности животных, в том числе при отравлениях и подозрении в отравлении ядами;

2. при желудочно-кишечных заболеваниях, при тяжело протекающих заболеваниях дыхательных органов, при септико-пиемических заболеваниях;

3. при обнаружении серозных и фибринозных перикардитов у свиней, при обширных ожогах и во всех других случаях при подозрении на наличие сальмонелл или токсигенных кокков;

4. при удалении кишечника из туши позднее 2 ч с момента обескровливания животного;

5. при наличии сомнений в отношении пригодности мяса и невозможности определить его пригодность в пищу путём ветеринарно-санитарного осмотра;

6. при недостаточном обескровливании туши;

7. при затруднении в определении пригодности мяса в пищу по данным санитарного анамнеза и осмотра на месте;

8. при расхождении результатов органолептической оценки и химических исследований;

9. при подозрении на то, что мясо или субпродукты послужили источниками пищевых отравлений.

В зависимости от конкретной ситуации показания могут быть расширены. Мясо, забракованное по органолептическим показаниям, микробиологическому исследованию, как правило, не подвергают, если не возникает необходимость выявления и идентификации патогенной микрофлоры (возбудителей сибирской язвы, БГКП, листереллёза, клостридиозов и др.).

**Подготовка проб к исследованию.** Каждый образец (мышцы, лимфатические узлы, паренхиматозные органы) перед посевом освобождают от видимой жировой и соединительной ткани, погружают на 2-3 мин в этиловый спирт-ректификат, 3 раза обжигают с поверхности. Затем стерильными ножницами из каждого образца (с различной глубины) вырезают кусочки. Лимфатические узлы разрезают пополам. Все вырезанные кусочки измельчают стерильными ножницами.

Для последующих исследований готовят две пробы по 15 г каждая. Одна проба состоит из кусочков мышц и лимфатических узлов, а вторая - из кусочков паренхиматозных органов (печени, почек, селезёнки). Каждую пробу помещают в стерильный стакан (колбу) гомогенатора, добавляют по 135 см<sup>3</sup> 0,9% раствора натрия хлорида и готовят взвеси в течение 2-5 мин. Полученные взвеси отстаивают 10 мин, и для исследований берут надосадочную жидкость. Выделение и идентификацию патогенных микроорганизмов проводят по общепринятым тестам.

В «Гигиенических требованиях к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» (СанПиН 2.3.2.1280-03) к мясу, как важнейшему сырьевому ресурсу пищевой промышленности, предъявляются жесткие санитарно-микробиологические требования.

## Лекция №3 (2 часа)

### Тема: «Санитарно-микробиологическое исследование молока»

#### 1. Вопросы лекции:

1. Источники обсеменения молока посторонней микрофлорой. Динамика развития микроорганизмов в молоке при хранении.

2. Санитарно-микробиологическая характеристика молока.

3. Пороки молока микробного происхождения.
4. Возбудители инфекционных болезней, передаваемые через молоко.

## **2. Краткое содержание вопросов:**

1. Источники обсеменения молока посторонней микрофлорой. Динамика развития микроорганизмов в молоке при хранении.

Молоко – ценнейший продукт питания, в нем содержится более 200 различных питательных и биологически активных веществ. В составе белков молока содержится 20 аминокислот, в том числе, незаменимые – лизин, метионин, триптофан и др. В молоке присутствуют жирные кислоты, большинство из которых являются непредельными, а поэтому очень легко усваиваются организмом человека. В молоке присутствуют как жирорастворимые витамины (A, D, E, K), так и практически весь спектр водорастворимых, в том числе C, P, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>.

Молоко служит хорошей питательной средой для микроорганизмов. При благоприятных условиях они размножаются в молоке, ухудшая его качество. К специфической микрофлоре молока и молочных продуктов относят возбудителей молочнокислого, спиртового и пропионовокислого брожения. Процессы, обеспечивающие жизнедеятельностью этих микроорганизмов, лежат в основе приготовления кисломолочных продуктов (творога, кефира, простокваша, ацидофилина и др.).

Бактерии молочнокислого брожения считаются нормальной микрофлорой молока и молочных продуктов. Главную роль при скисании молока и молочных продуктов играют молочнокислые стрептококки *S. lactis*, *S. cremoris* и др. Менее активные виды молочнокислых стрептококков (*S. citrovorus*, *S. lactis* subsp. *diacetylactis*) продуцируют летучие кислоты и ароматические вещества и поэтому широко используются при получении сыров. В группу молочнокислых бактерий также входят молочнокислые палочки: (*L. acidophilus*, *L. casei* и др.). Спиртовое брожение молока и молочных продуктов вызвано в основном дрожжами (*Saccharomyces lactis* и др.).

Неспецифическую микрофлору молока составляют гнилостные бактерии (род *Proteus*), аэробные и анаэробные бациллы (*B. subtilis*, *B. megatherium*, *C. putrificum*) и многие другие. Эти микроорганизмы разлагают белок молока, участвуют в молочнокислом брожении и придают молоку неприятный вкус и запах. Поражение молочнокислых продуктов плесенью родов *Mucor*, *Oidium*, *Aspergillus* и др. придаёт им вкус прогорклого масла. БГКП, попадая в молоко, вызывают изменение вкуса и запаха молока. Другие виды грамотрицательных бактерий (*B. fluorescens*, *P. putrifaciens* и др.) обладают различной степенью протеолитической активности и придают молоку и молочнокислым продуктам прогорклый горький вкус и гнилостный запах.

Основными источниками обсеменения молока служат кожа и вымя животного, загрязненные навозом, кормами.

Источником микрофлоры молока может быть сухой корм, при раздаче которого образуется много пыли. В этом отношении применение доильных машин значительно уменьшает возможность попадания микроорганизмов из воздуха. Плохой силос, корма, загрязненные почвой, способствуют обсеменению продуктов маслянокислыми бактериями.

Болезнетворные бактерии и кишечная палочка могут попасть в молоко с рук и одежды обслуживающего персонала.

При централизованном вывозе молока предусматриваются его охлаждение и временное хранение на ферме в течение 12–20 ч. В молоке, поступившем на молокосборные пункты с задержкой или оставленном на хранение, развиваются микроорганизмы, проходя несколько фаз.

**Бактерицидная (антибиотическая) фаза.** В молоке после его получения бактерии не размножаются, иногда их количество даже уменьшается. Это объясняется тем, что в свежем молоке содержатся вещества, подавляющие развитие бактерий. Это - антитела

(антитоксины, агглютинины, бактериолизины и др.), иммуноглобулины, лизоцим, ферменты (пероксидазы) и др. Они синтезируются в молочной железе или поступают из крови. Продолжительность бактерицидной фазы зависит от количества бактерий (чем меньше бактерий в молоке, тем длительнее бактерицидная фаза), температуры хранения (с понижением температуры бактерицидная фаза увеличивается), индивидуальных свойств животного (молоко разных животных обладает неодинаковыми бактерицидными свойствами).

Чтобы продлить бактерицидную фазу, молоко после его получения нужно немедленно охладить. При нагревании до температуры пастеризации (выше 60°C) молоко теряет бактерицидные свойства, так как разрушаются антимикробные вещества.

*Фаза смешанной микрофлоры.* С инактивацией лизоцима, и других веществ заканчивается антимикробная фаза, начинается развитие всех групп микроорганизмов (если молоко хранится при температуре выше 10°C), попавших в молоко и способных развиваться при данной температуре. В конце этой фазы преобладают молочнокислые бактерии, которые образуют молочную кислоту. Они подкисляют среду и подавляют развитие психрофильных микроорганизмов - флуоресцирующих и других бактерий (микрококков, споровых палочек, бактерий группы кишечной палочки), разлагающих белки, жиры, выделяющих продукты жизнедеятельности и ухудшающих качество молока.

При охлаждении молока от 8 до 0°C молочнокислые бактерии не развиваются. Молоко несколько суток остается без видимых изменений, однако при его длительном хранении численность психрофильных микроорганизмов постепенно нарастает. Поэтому хранение и транспортировку молока на завод необходимо осуществлять без задержки, подвергая его там механической и термической обработке.

*Фаза молочнокислых бактерий.* Начинается при температуре хранения молока выше 10°C. Начало этой фазы - нарастание кислотности и преобладание молочнокислых стрептококков (свыше 50% от общей численности бактерий). В разгар данной фазы преобладают молочнокислые бактерии, главным образом молочнокислые стрептококки, увеличивается кислотность молока до 60°Т и выше, происходит его сквашивание. Когда кислотность молока становится предельной для стрептококков (120°Т), они начинают отмирать, продолжают развиваться молочнокислые палочки, как более кислотоустойчивые. После увеличения кислотности до 250-300°Т погибают и молочнокислые палочки.

*Фаза развития дрожжей и плесеней.* На поверхности кислого молока первоначально развиваются молочная плесень, пенициллы и дрожжи. В результате жизнедеятельности плесеней кислотность молока снижается вследствие частичного потребления ими молочной кислоты и нейтрализации ее щелочными продуктами, образующимися при распаде белка. При снижении кислотности создаются благоприятные условия для развития гнилостных бактерий, которые еще более ускоряют разложение белков молока. При хранении молока в естественных условиях проявляются такие типы взаимоотношений, как антагонизм и метабиоз. Молоко постепенно разлагается.

## 2. Санитарно-микробиологическая характеристика молока.

К молоку как к сырью для производства высококачественных молочных продуктов предъявляют требования по органолептическим, физико-химическим и санитарно-ветеринарным показателям согласно ГОСТ Р 52054–2003.

С 1970 г. по настоящее время в РФ ГОСТ на сырое молоко менялся трижды: при этом требования к композиционным свойствам молока, то есть органолептическим показателям, степени чистоты, кислотности, плотности оставались без изменения; но повышались требования к технологическим свойствам молока и его безопасности. Основным показателем сортности молока во всех случаях является его общая бактериальная обсемененность.

Выявление соматических клеток в молоке является важным диагностическим фактором его качества. Европейский стандарт допускает их наличие в количестве не более

250 тыс./см<sup>3</sup>, а по ГОСТ РФ от 2003 г. – не более 500 тыс. в 1 см<sup>3</sup>. Примесь 5–10% молока от больных скрытым маститом коров делает все молоко непригодным для переработки на сыры и молочные продукты. Молоко, идущее на выработку продуктов детского питания, сырчужных сыров, стерилизованных продуктов, должно отвечать требованиям высшего и первого сортов, но с содержанием соматических клеток не более 500 тыс./см<sup>3</sup>. Молоко от больных или подозреваемых в заболевании животных, использование которого разрешается ветеринарным надзором только после тепловой обработки, принимается как несортоное и перерабатывается отдельно.

На молочных заводах молоко подвергают пастеризации. Пастеризованным называют молоко, нагретое до температуры 63<sup>0</sup>С и выше, но ниже точки кипения, немедленно охлаждаемое и разлитое в тару. Для всех видов пастеризованного молока степень чистоты по эталону должна быть не ниже I группы, кислотность – 21<sup>0</sup>T; для молока повышенной жирности – 20<sup>0</sup>T, а для белкового – 25<sup>0</sup>T. В зависимости от бактериальной обсемененности пастеризованное молоко делят на 2 группы: общее количество бактерий в 1 мл пастеризованного молока группы А (разлитое в бутылки или пакеты) должно быть не более 75 тыс. в мл, титр *E. coli* – 3 мл; в молоке группы Б – соответственно 100 тыс./мл и 0,3 мл. ОМЧ пастеризованного молока во флягах и цистернах не более 300 000 КОЕ в мл, титр кишечной палочки – 0,3 мл.

Молоко, предназначеннное для детских учреждений, должно иметь кислотность не более 19<sup>0</sup>T и по микробиологическим показателям соответствовать молоку группы А. Пастеризованное коровье молоко не должно содержать патогенных микроорганизмов.

Сливки согласно ТУ 10.02.02.789.08 вырабатывают с содержанием жиров 10, 20, 35% из коровьего молока путем его сепарирования. В основном их используют для производства масла и сметаны. В зависимости от бактериальной обсемененности их делят на две категории: пастеризованные сливки группы А, содержащие не более 100 тыс. бактерий в 1 мл, титр *E. coli* – 3 мл; пастеризованные сливки группы Б, содержащие не более 300 тыс. бактерий в 1 мл, титр *E. coli* – не более 0,3.

### 3. Пороки молока микробного происхождения.

Различают несколько видов пороков молока, вызываемых различными микроорганизмами:

- горький вкус придают молоку гнилостные микроорганизмы, в частности сенная и картофельная палочки, дрожжи;

- прогорклость возникает при длительном хранении молока на холоде в связи с гидролизом жиров, происходящим под воздействием бактериальной липазы, выделяемой представителями родов *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*;

- сильное газообразование, появляющееся при брожении за счет развития в сыром молоке *E. coli* и других представителей БГКП, а также дрожжей-сахаромицетов, а в пастеризованном молоке – за счет развития маслянокислых бацилл. Сыр, выработанный из такого молока, пронизан большим количеством пузырьков, при слиянии которых образуются полости. Такой продукт быстро теряет свою питательную ценность и товарный вид;

- «тягучее молоко», которое образуется при размножении в нем так называемой палочки тягучего молока (*Bact. lactis viscosum*);

- изменение цвета вызывают пигментные бактерии, образующие колонии синего, красного и оранжевого цвета.

### 4. Возбудители инфекционных болезней, передаваемые через молоко.

Молоко и молочные продукты могут становиться причиной серьезных заболеваний человека.

К болезням, общим для человека и животных, возбудители которых передаются через молоко, следует в первую очередь отнести зоонозы:

- туберкулез – хроническое заболевание животных. Выделяясь с молоком, микобактерии туберкулеза способны долго сохраняться во внешней среде. В обычных

условиях они выживают в течение 10 дней, в сливочном масле, хранящемся на холоде, – до 300 дней, в сырах – до 200. Молоко из неблагополучного по туберкулезу хозяйства пастеризуют непосредственно на ферме при температуре 85<sup>0</sup>С в течение 30 минут или при температуре 90<sup>0</sup>С в течение 5 мин. Обеззараженное таким способом молоко, полученное от животных оздоровляемых групп, отправляется на молокозавод, где его повторно пастеризуют и принимают вторым сортом. Молоко животных, положительно реагирующих на туберкулин, обеззараживают кипячением, после чего используют при откорме молодняка. Молоко, полученное от животных с клиническими признаками туберкулеза, используют в рационе откормочных животных после 10-минутного кипячения. Молоко уничтожается при туберкулезе вымени.

- Бруцеллез – хроническая болезнь животных. Выявляется в молоке кольцевой пробой, основанной на обнаружении соответствующих антител. Бруцеллы способны сохраняться в масле и сыре до 40–60 дней. Они чувствительны к высоким температурам и при 70<sup>0</sup>С погибают через 30 минут, а при 85–90<sup>0</sup>С – через 20 сек. В хозяйствах, неблагополучных по бруцеллезу, запрещается вывоз молока оздоровляемого стада в необеззараженном виде. Такое молоко пастеризуют и либо вывозят на молокозавод, либо используют внутри хозяйства. Молоко коров, положительно реагирующих на бруцеллез, кипятят и используют на внутрихозяйственные нужды.

- Лейкоз. Молоко клинически больных лейкозом коров подлежит обязательному уничтожению. Молоко животных, подозреваемых в заболевании лейкозом, может быть использовано в пищу только после соответствующего обеззараживания: кипячения в течение 5 мин или пастеризации в течение 30 мин.

- Мастит – воспаление вымени дойных коров, вызываемое стафилококками (*S. aureus*, *S. saprophyticus*), стрептококками (*Str. pyogenes*), синегнойной палочкой (*Ps. aeruginosa*). Из молока больных маститом животных невозможно приготовить качественные молочные продукты. Небольшая примесь такого молока в сборном молоке, полученном от группы коров, значительно ухудшает качество сыров и уменьшает выход этого продукта. Если в молоке животных, больных маститом, не обнаруживаются органолептические изменения, его пастеризуют. Но если в молоке обнаруживаются гной и хлопья, его уничтожают.

## 2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

### **Лабораторная работа №1. Определение санитарно-показательных микроорганизмов (2 часа)**

**Цель:** изучить методы выделения санитарно-показательных, патогенных микроорганизмов и микроорганизмов порчи.

Санитарно-показательные микроорганизмы – это микроорганизмы постоянно обитающие в естественных полостях тела человека и животных, откуда они поступают в окружающую среду, где могут сохранять жизнеспособность в течение определённого времени. Обнаружение СПМО в окружающей среде свидетельствует о загрязнении ее выделениями человека или животных и косвенно указывает на возможность присутствия в исследуемом объекте патогенного микроорганизма.

#### **Работа**

**Задание 1.** Определить общее микробное число (количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов).

Из пробы продукта готовят разведения. Выбирают те разведения, при посеве которых на чашках вырастает не менее 30 и не более 300 колоний. Осуществляют посев, внося в стерильные чашки Петри по 1 мл разведения, слегка приоткрывая крышки. В каждую чашку вливают 8-12 мл расплавленного и остуженного до 45-49°C питательного агара после фламбирования края посуды, в которой он содержится. Затем быстро смешивают содержимое чашек, равномерно распределяя по всему дну, избегая образования пузырьков воздуха. После застыивания агара помещают в термостат вверх дном и инкубируют при температуре  $37\pm1^{\circ}\text{C}$  в течение  $24\pm2\text{ч}$ . Учет результатов осуществляют путём подсчёта всех выросших на чашке колоний, наблюдаемых при увеличении в 2 раза. Количество колоний на обеих чашках суммируют и делят на два. Результат выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл исследуемой пробы.

**Задание 2.** Выделить из исследуемого материала бактерии группы кишечной палочки.

Бактерии группы кишечной палочки – это м/о, обитающие в кишечнике. Будучи неспорообразующими и некислотоустойчивыми формами, БГКП служат показателем антисанитарного состояния производства, свидетельствуют о свежем фекальном загрязнении.

В качестве среды накопления (жидкая элективная среда, для увеличения количества искомого микроорганизма в смешанной популяции) используют среду Кесслера, в состав которой входят вещества (жёлчь, краситель генциановый фиолетовый), подавляющие рост грамположительных микробов. Посевы инкубируют 48 часов при  $43^{\circ}\text{C}$ . При наличии БГКП в среде отмечается газообразование.

В связи с тем, что в пробах могут быть другие бактерии, сбраживающие лактозу с образованием газа, точно установить наличие кишечной палочки можно, сделав посев из забродившей жидкости на среду Эндо. При образовании на среде Эндо после инкубации в течение суток при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  характерных колоний красного цвета с металлическим оттенком готовят мазки, окрашивают по Граму. Наличие грамотрицательных палочек, не обладающих оксидазной активностью, свидетельствует о присутствии бактерий группы кишечной палочки (БГКП) в данной пробе.

**Задание 3.** Выделить из исследуемого материала *S. aureus*.

*S. aureus* может стать причиной пищевого токсикоза - острого отравления энтеротоксином, который накапливается в пищевом продукте при размножении стафилококков. Энтеротоксин - это экзотоксин, способный воздействовать на слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта.

Для определения в пробах патогенного стафилококка осуществляют посев в среду накопления - солевой бульон: МПБ + 6 %-й NaCl. Посевы помещают в термостат на 24 часа при  $37^{\circ}\text{C}$ . При наличии признаков роста: помутнение среды, образование осадка,

производят пересев со среды накопления на дифференциально-диагностические среды: желточно-солевой агар и плазму крови кролика. Инкубируют 18-24 ч при 37°C. На ЖСА вырастают колонии правильной круглой формы, выпуклые, с гладкой поверхностью, ровными краями, непрозрачные, вокруг колоний стафилококков, обладающих лецитиназной активностью, образуются зоны помутнения с перламутровым оттенком – радужный венчик. При наличии плазмокоагулязы у исследуемого стафилококка, образуется плотный сгусток плазмы или сгусток в виде взвешенного мешочка. Наличие лецитовителазы и плазмокоагулязы у выделенного стафилококка свидетельствует о его патогенности.

Из культур, выросших на ЖСА, готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Золотистый стафилококк имеет вид грамположительных кокков, расположенных в виде скоплений неправильной формы, а также единично, парами или цепочками из 3-4-ёх клеток.

Таблица 1

#### Характеристика санитарно-показательных микроорганизмов

| СПМО             | Культуральные свойства | Результат микроскопии |
|------------------|------------------------|-----------------------|
| БГКП             | Среда Эндо             |                       |
| <i>S. aureus</i> | ЖСА                    |                       |
|                  | Плазма крови кролика   |                       |

По окончании лабораторной работы проанализировать полученные результаты.

**Материалы и оборудование:** культуры *E.coli* на среде Эндо, чистая культура *Proteus vulgaris*, солевой бульон, среда Кесслера, желточно-солевой агар с культурой *S. aureus*, чашки с МПА, свежескошенный МПА в пробирках, плазма крови кролика, предметные стекла, спиртовки, микроскопы, наборы для окрашивания по Граму, дезинфицирующий раствор, термостат.

#### Лабораторная работа №2. Микробиологический анализ мяса (2 часа)

**Цель:** Изучить принцип микробиологического анализа мяса.

##### Работа

**Задание 1.** Изучить микрофлору мяса и определить его качество.

На предметных стеклах делают два мазка-отпечатка - один с поверхности, другой из глубинного слоя. Для приготовления мазка-отпечатка с поверхности мяса стерильными ножницами вырезают кусочек 0,5-1 г, прикладывают срезанной стороной к поверхности обезжиренного, про-фламбированного предметного стекла. Чтобы сделать мазки-отпечатки из глубоких слоев, поверхность мяса прожигают нагретым шпателем, стерильным ножом делают надрез и из глубины берут небольшой кусочек (0,5-1 г), который прикладывают к профламбированному стеклу.

Препараты подсушивают на воздухе, фиксируют смесью спирта с эфиром, окрашивают фуксином и микроскопируют, подсчитывают количество микроорганизмов в поле зрения, отмечая их форму.

**Примечание:** мазок-отпечаток из свежего мяса обычно плохо окрашивается. Если он получен с поверхностного слоя мяса, то в поле зрения встречаются единичные палочки и кокки. В препаратах из глубоких слоев они или отсутствуют, или встречаются не во всех полях зрения. Мазок-отпечаток из мяса подозрительной свежести окрашивается удовлетворительно. При его просмотре в поле зрения обнаруживают несколько десятков

микробов. Особенно много их в мазке с поверхностного слоя. Мазок-отпечаток из испорченного мяса окрашивается хорошо. В поле зрения препаратов как с поверхностных, так и из глубинных слоев встречается в среднем более 30 микробов, среди которых преобладают палочки. При разложении мяса кокки в отпечатках почти отсутствуют и все поле зрения усеяно палочками.

**Задание 2.** Определить наличие анаэробов в мясе. Поверхность мяса прижигают нагретым шпателем, стерильным скальпелем делают надрез и берут из глубины небольшой кусочек. Соблюдая правила асептики, его опускают в пробирку с расплавленным, предварительно охлажденным до 50°C МПА. В результате вращения пробирки между ладонями кусочек мяса должен осесть на дно пробирки.

Опытные пробирки с МПА помещают в термостат при 40°C. После инкубирования посевов в термостате в течение нескольких дней пробирки просматривают визуально.

*Примечание:* если мясо несвежее, на МПА развиваются газообразующие анаэробные формы и в среде обнаруживают разрывы агара вследствие выделения микроорганизмами газа. В пробирках со свежим мясом столбик МПА плотный и не содержит разрывов и трещин, так как газообразующие анаэробные формы в нем не развиваются.

По окончании опыта проанализировать полученные результаты, занести их в таблицу 2 и на основании проведенного бактериологического анализа сделать заключение о качестве образцов мяса.

Таблица 2

#### Бактериологический анализ мяса

| Образец мяса              | Количество микроорганизмов в 1-ом поле зрения |         | Наличие анаэробов в мясе |
|---------------------------|---|---------|--------------------------|
|                           | кокки   | палочки |                          |
| <i>Глубокий слой</i>      |   |         |                          |
|                           |   |         |                          |
| <i>Поверхностный слой</i> |   |         |                          |
|                           |   |         |                          |

**Материалы и оборудование:** пробы сырого мяса, стерильные пробирки с пробками, МПА, предметные стекла, спиртовки, микроскопы, смесь спирта с эфиром, фуксин, стерильные шпатели, скальпели, ножницы, иммерсионное масло, дезинфицирующий раствор, термостат.

### Лабораторная работа №3. Микробиологический анализ молока (2 часа)

**Цель:** Изучить санитарную оценку молока.

#### Работа

**Задание 1.** Провести редуктазную пробу.

В чистые пробирки наливают 1 мл раствора метиленового синего и 20 мл исследуемого молока, предварительно нагревшегося до 38-40°C. После перемешивания, содержимое пробирки помещают на водянную баню при 40°C (указанная температура оптимальная для редуктазы) и наблюдают за обесцвечиванием через 20 мин, 2 ч и 5,5 ч. По времени обесцвечивания резазурина молоко разделяют на четыре класса.

**Задание 2.** Определить общее количество бактерий в молоке.

Вначале готовят разведения ( $10^{-1}$ – $10^{-6}$ ), для чего из отобранный пробы стерильной пипеткой берут 1 мл молока и переносят в пробирку, содержащую 9 мл стерильной воды. Содержимое пробирки взбалтывают 1 мин и, таким образом, получают разведение  $10^{-1}$ . Из первой пробирки 1 мл разведения переносят во вторую пробирку с 9 мл стерильной воды (разведение 1:100) и т.д. При обесцвечивании молока в пробе на редуктазу до 20 минут, делают посев по 1 мл из разведений  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  в чашки с мясопептонным агаром. При обесцвечивании молока в пробе на редуктазу после 20 мин, делают посев из разведений

$10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ . Чашки Петри с посевом помещают в термостат при  $37^{\circ}\text{C}$ . После 3-дневной инкубации подсчитывают колонии бактерий в чашках. Количество дрожжей и плесеней определяют на четвертый день. Число колоний умножают на степень разведения и находят среднее арифметическое на основании результатов подсчета колоний на трех чашках, что соответствует числу клеток в 1 мл молока.

**Задание 3.** Определить титр кишечной палочки.

Коли-титр молока определяют бродильным методом. Для этого в шесть пробирок разливают по 5 мл среды Кесслера, в состав которой входят вещества (желчь, краситель генциановый фиолетовый), подавляющие рост молочнокислых и других грамположительных микробов. В первые три пробирки вносят по 1 мл цельного молока, в следующие три - по 1 мл молока, десятикратно разведенного стерильной водой. Посевы инкубируют 48 часов при  $43^{\circ}\text{C}$ .

Отсутствие газообразования во всех шести пробирках указывает на чистоту продукта, и его коли-титр считают выше 3 мл; при газообразовании в одной пробирке, засеянной 1 мл исследуемого продукта, коли-титр равен 3 мл; при образовании газа в одной пробирке с 0,1 мл коли-титр равен 0,3 мл; при образовании газа в шести или пяти пробирках коли-титр менее 0,3 мл (такое молоко непригодно к употреблению).

В связи с тем, что в пробах молока могут быть другие бактерии, сбраживающие лактозу с образованием газа, точно установить наличие кишечной палочки можно, сделав посев из забродившей жидкости на среду Эндо. Образование на среде Эндо после инкубации в течение суток при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  характерных колоний красного цвета с металлическим оттенком указывает на наличие кишечной палочки. Готовят мазки, окрашивают по Граму. Наличие грамотрицательных палочек свидетельствует о наличии бактерий группы кишечной палочки (БГКП) в данной пробе.

По окончании опыта проанализировать полученные результаты, занести их в таблицу 3 и на основании проведенного бактериологического анализа сделать заключение о качестве образцов молока.

**Оценка качества молока**

Таблица 3

| Образцы молока | Время обесцвечивания молока, мин | Количество микроорганизмов в 1 мл молока, КОЕ/мл | Титр кишечной палочки, мл | Рост на среде Эндо | Результаты микроскопии (рисунок) |
|----------------|----------------------------------|--|---------------------------|--------------------|----------------------------------|
|                |                                  |  |                           |                    |                                  |

**Материалы и оборудование:** пробы молока, стерильные пробирки со средой Кесслера и поплавками, стерильные чашки Петри, МПА, водяная баня, метиленовый синий, стерильные пробирки с пробками, стерильные пипетки на 1 и 10 мл, стерильные воды, чашки Петри со средой Эндо, бактериальные петли, предметные стекла, спиртовки, микроскопы, красители для окраски по Граму, дезинфицирующий раствор, иммерсионное масло, термостат.

### 3. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ

#### **Практическое занятие №1. Микробиологический анализ кисло-молочных продуктов (2 часа)**

**Цель:** провести санитарно-микробиологическую оценку кисло-молочных продуктов.

#### **Работа**

##### **Задание 1.** Изучить микрофлору сыра.

При изучении микрофлоры сыра можно использовать метод отпечатков для установления естественного расположения микроорганизмов в сыре.

Для исследования берут свежий сыр. Сначала фламбированным ножом срезают то место, где будет взята проба. Затем срезают тонкий кусочек сыра и плотно сдавливают его двумя сухими чистыми предметными стеклами. Стекла осторожно разъединяют и удаляют сыр. Полученный на стекле мазок-отпечаток сушат вдали от пламени, фиксируют смесью спирта с эфиром и окрашивают метиленовым синим.

**Примечание:** При микроскопировании крупных сыров (типа советского, швейцарского) выявляют палочковидные формы молочнокислых и пропионовокислых бактерий, при микроскопировании мелких (типа голландского) - молочнокислые стрептококки.

##### **Задание 2.** Определить наличие микробов порчи в кефире.

Для выявления микробов порчи сделать микропрепарат и окрасить метиленовым синим. Рассмотреть под микроскопом приготовленный мазок (сделать рисунок).

Сделать вывод, сравнивая результаты микроскопии и учитывая, что в норме в кефире должны быть обнаружены молочнокислые стрептококки (часто в виде диплококков), небольшое количество молочнокислых палочек и единичные дрожжевые клетки.

Полученные данные по окончании исследования внести в таблицу 1, оценить соответствие кисломолочных продуктов требованиям ГОСТ.

Таблица 1

#### **Микроскопический анализ кисломолочных продуктов**

| <b>Наименование продукта</b> | <b>Фактический состав исследуемого материала (рисунок)</b> | <b>Ориентировочное количество кисломолочных микроорганизмов</b> | <b>Соответствие требованиям ГОСТ</b> |
|------------------------------|--|---|--------------------------------------|
| Творог                       |  | Молочнокислые стрептококки                                      |                                      |
| Кефир                        |  | Молочнокислые стрептококки и палочки, единичные дрожжи          |                                      |

##### **Задание 3.** Определить БГКП в пробах творога и кефира.

Суть метода – способность БГКП (бесспоровые грамотрицательные аэробные и факультативно анаэробные палочки в основном являющиеся представителями родов *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*) сбраживать в питательной среде лактозу с образованием кислоты и газа при температуре 37°C в течении 24 ч.

Отобранные пробы кисломолочных продуктов и продуктов закваски тщательно перемешивают и нейтрализуют. Для этого отбирают стерильной пипеткой 10 см<sup>3</sup> исследуемого продукта в стерильную пробирку или колбу, добавляя 1,0 см<sup>3</sup> стерильного 10% раствора двууглекислого натрия, и содержимое перемешивают. 10 г творога или сыра взвешивают на стерильном часовом стекле и тщательно растирают в ступке.

Перед посевом берут 10 см<sup>3</sup> исследуемого продукта и вносят в 90 см<sup>3</sup> стерильного раствора хлористого натрия или фосфатного буфера, получая разведение 1:10. Из первого разведения готовят последующие 1:100, 1:1000, 1: 10000. В среду Кесслера проводят посев по 1 см<sup>3</sup> из каждого разведения (для творога) и 1 см<sup>3</sup> чистого продукта, 1:10, 1:100 (для кефира). Пробирки или колбы помещают в термостат на 18-24 ч. при температуре 37<sup>0</sup>С. Просматривают пробирки. При отсутствии газообразования в наименьшем из засеваемых объёмов считается, что БГКП в нём не обнаружены. При наличии газообразования в наименьшем из засеваемых объёмов считается, что БГКП в нём обнаружены.

По окончании опыта проанализировать полученные результаты, занести их в таблицу 2 и на основании проведенного бактериологического анализа сделать заключение о качестве исследуемых образцов.

Таблица 2

**Бактериологический анализ кисломолочных продуктов**

| Наименование продукта | Разведения                         |      |       |        |         |
|-----------------------|------------------------------------|------|-------|--------|---------|
|                       | 1 см <sup>3</sup> чистого продукта | 1:10 | 1:100 | 1:1000 | 1:10000 |
| Творог                | -                                  |      |       |        |         |
| Кефир                 |                                    |      |       | -      | -       |
| Образование газа      |                                    |      |       |        |         |

**Материалы и оборудование:** пробы кефира и творога, стерильные пробирки с пробками, МПА, стерильные пробирки со средой Кесслера и поплавками, стерильные чашки Петри, метиленовый синий, стерильные пробирки с пробками, стерильные пипетки на 1 и 10 мл, стерильные воды, физиологический раствор (0,9% раствор NaCl), 10% раствор двууглекислого натрия, бактериальные петли, предметные стекла, спиртовки, микроскопы, красители для окраски по Граму, дезинфицирующий раствор, иммерсионное масло, термостат.