

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

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

**Б1.В.04 Микробиологическая безопасность сырья и
продуктов животного и растительного происхождения**

Направление подготовки: 36.04.01 Ветеринарно-санитарная экспертиза

Профиль образовательной программы: Ветеринарно-санитарная экспертиза

Форма обучения: очная

СОДЕРЖАНИЕ

1.	Методические указания по выполнению лабораторных работ.....	3
1.1.	Лабораторная работа № ЛР-1 Определение СПМО в объектах внешней среды.....	3
1.2.	Лабораторная работа № ЛР-2 Определение патогенных микроорганизмов и микроорганизмов порчи в объектах внешней среды.....	5
1.3.	Лабораторная работа № ЛР-3-4 Микробиологический анализ мяса и мясных продуктов.....	7
1.4.	Лабораторная работа № ЛР-5-6 Микробиологический анализ рыбы.....	9
1.5.	Лабораторная работа № ЛР-7-8 Микробиологический анализ молока и молочных продуктов.....	10
1.6.	Лабораторная работа № ЛР-9 Микробиологический анализ яиц.....	12
1.7.	Лабораторная работа № ЛР-10-11 Микробиологический анализ фруктов...	13
1.8.	Лабораторная работа № ЛР-12-13 Микробиологический анализ овощей...	15
1.9.	Лабораторная работа № ЛР-14 Бактериологическая диагностика стафилококкового пищевого токсикоза.....	17
1.10.	Лабораторная работа № ЛР-15 Бактериологическая диагностика пищевой токсикоинфекции, вызванной <i>B. cereus</i>	18
1.11.	Лабораторная работа № ЛР-16 Бактериологическая диагностика ботулизма.....	21

1. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

2.1 Лабораторная работа № 1 (2 часа).

Тема: «Определение СПМО в объектах внешней среды»

2.1.1 Цель работы: изучить методы санитарно-микробиологического исследования; методы определения санитарно-показательных микроорганизмов.

2.1.2 Задачи работы:

1. Определить наличие в исследуемом материале бактерий группы кишечной палочки.
2. Определить наличие в исследуемом материале патогенного *S. aureus*
3. Определить наличие в исследуемом материале микроорганизмов рода *Proteus*.

2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Культуры *E.coli* на среде Эндо и среде Кесслера, чистая культура *Proteus vulgaris* на скошенном МПА, солевой бульон и желточно-солевой агар с культурой *S. aureus*, чашки с МПА, свежескошенный МПА в пробирках, плазма крови кролика в пробирках, предметные стекла, покровные стёкла, предметные стёкла с лункой, вазелин, иммерсионное масло, спиртовки, микроскопы, наборы для окрашивания по Граму, дезинфицирующий раствор, термостат.

2.1.4 Описание (ход) работы:

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

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 микроорганизмов вне организма свидетельствует о загрязнении соответствующими выделениями. Выделяемые в этих случаях микроорганизмы служат показателями санитарного неблагополучия, потенциальной опасности исследуемых объектов, и поэтому названы «санитарно-показательными».

Санитарно-показательные микроорганизмы — это микроорганизмы постоянно обитающие в естественных полостях тела человека и животных, откуда они поступают в окружающую среду путями, общими с патогенами, где могут сохранять жизнеспособность в течение определённого времени.

Однако не все микроорганизмы, входящие в состав нормальной флоры тела человека или животных, могут быть признаны санитарно-показательными. На основании многочисленных исследований были сформулированы требования, которым должны отвечать санитарно-показательные микроорганизмы (СПМО):

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 микроорганизмов, выводимых из организма теми же путями.

3. Они не должны размножаться в окружающей среде.

4. Они не должны сколько-нибудь значительно изменять свои биологические свойства в окружающей среде.

5. Они должны быть достаточно типичными, с тем, чтобы их дифференциальная диагностика осуществлялась без особого труда.

6. Индикация, идентификация и количественный учет должны производиться современными, простыми, легкодоступными и экономичными микробиологическими методами.

Обнаружение СПМО в окружающей среде свидетельствует о загрязнении ее выделениями человека или животных и косвенно указывает на возможность присутствия в исследуемом объекте патогенных микроорганизмов.

СПМО разделены на три группы:

1-я группа - индикаторы фекального загрязнения - представители микрофлоры кишечника человека и животных (бактерии группы кишечных палочек (БГКП), энтерококки, протей, сульфитредуцирующие клостридии; термофилы, кишечные бактериофаги, сальмонеллы; бактероиды, бифидо- и лактобактерии и т.д.).

2-я группа - индикаторы воздушно-капельного загрязнения - комменсалы верхних дыхательных путей (стрептококки; стафилококки).

3-я группа - индикаторы процессов самоочищения — обитатели внешней среды (протеолиты; аммонификаторы и нитрификаторы; аэромонасы и бделловибрионы; споровые микроорганизмы и т.д.).

Работа

Задание 1. Определить наличие в исследуемом материале бактерий группы кишечной палочки.

Группа кишечных палочек - грамотрицательные, не образующие спор, короткие палочки, сбраживающие глюкозу и лактозу с образованием кислоты и газа при температуре $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 24-48 часов, не обладающие оксидазной активностью. Эта группа представлена микроорганизмами родов *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, обитающими 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) для выделения БГКП используют среду Кесслера, в состав которой входят вещества (жёлчь, краситель генциановый фиолетовый), подавляющие рост грамположительных микроорганизмов. Посевы инкубируют 48 часов при 43°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 БГКП можно, сделав посев из забродившей жидкости на среду Эндо. При образовании на среде Эндо после инкубации в течение суток при температуре 37°C характерных колоний красного цвета с металлическим блеском готовят мазки, окрашивают по Граму. Наличие грамотрицательных палочек, не обладающих оксидазной активностью, свидетельствует о присутствии бактерий группы кишечной палочки (БГКП) в данной пробе.

Задание 2. Определить наличие в исследуемом материале патогенного *S. aureus*.

Патогенный *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 с добавлением 6% NaCl). Посевы помещают в термостат на 24 часа при 37⁰С. При наличии признаков роста: помутнение среды, образование осадка, проводят пересев со среды накопления на дифференциально-диагностическую среду (желточно-солевой агар - ЖСА) и плазму крови кролика. Инкубируют 18-24 часа при 37⁰С. 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 плазмокоагулазы у исследуемого стафилококка, образуется плотный сгусток плазмы или сгусток в виде взвешенного мешочка. Наличие лецитовителлазы и плазмокоагулазы у выделенного стафилококка свидетельствует о его патогенности.

Из культур, выросших на ЖСА, готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Золотистые стафилококки – грамположительные кокки, расположенные одиночно, парами, короткими цепочками из 3-4 клеток и скоплениями неправильной формы в виде виноградных кистей (результат характерного деления более чем в одной плоскости).

Задание 3. Определить наличие в исследуемом материале микроорганизмов рода *Proteus*.

Присутствие в воде и пищевых продуктах представителей рода *Proteus* свидетельствует о загрязнении объекта разлагающимися органическими субстратами, это признак начала гнилостных изменений. При массовом обсеменении употребляемого в пищу продукта протеи могут вызвать пищевые токсикоинфекции. На присутствие бактерий рода *Proteus* исследуют продукцию предприятий общественного питания, меланж, яичный порошок.

С помощью стерильной пипетки 0,5 мл исходного разведения анализируемой пробы продукта вносят в конденсационную воду свежескошенного МПА, не касаясь поверхности среды (метод Шукевича). Пробирки с посевами, вертикально поставленными в штатив, инкубируют 18-24 часа при 37⁰С. После инкубирования обращают внимание на наличие ползучего вуалеобразного налёта с голубым оттенком на поверхности скошенного агара и подъёму культуры из конденсационной жидкости вверх по поверхности среды. При наличии такого роста культуру бактерий микроскопируют, изучают её подвижность в препарате «висячая» капля и биохимические свойства стандартными методами.

Обнаружение полиморфных грамотрицательных палочек, ферментирующих лактозу и манит, образующих сероводород, дающих ползучий рост, вследствие высокой подвижности, по поверхности скошенного агара, указывает на наличие в продукте микроорганизмов рода *Proteus*.

2.2 Лабораторная работа № 2 (2 часа).

Тема: «Определение патогенных микроорганизмов и микроорганизмов порчи в объектах внешней среды»

2.2.1 Цель работы: изучить методы определения патогенных микроорганизмов и микроорганизмов порчи в объектах внешней среды.

2.2.2 Задачи работы:

1. Определить наличие в исследуемом материале микроорганизмов рода *Salmonella*.
2. Определить микроорганизмы порчи: дрожжи и плесневые грибы.

3. Определить общее микробное число (количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ)).

2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Культуры *Salmonellaspp.* на висмут-сульфитном агаре, чашки с МПА с изолированными колониями, среда Сабуро, культуры плесневых грибов и дрожжей, предметные стекла, иммерсионное масло, спиртовки, микроскопы, наборы для окрашивания по Граму, дезинфицирующий раствор, термостат.

2.2.4 Описание (ход) работы:

Задание 1. Определить наличие в исследуемом материале микроорганизмов рода *Salmonella*.

Сальмонеллы – возбудители пищевых токсикоинфекций, характеризующихся тяжелым течением. Попадают в окружающую среду и пищевые продукты с хозяйственно-фекальными водами, содержащими выделения кишечника человека и животных. Главный источник возбудителя – мясо вынужденно убитых животных.

Для выявления бактерий рода *Salmonella* навеску исследуемого продукта высевает в забуференную пептонную воду (среда первичного обогащения), которую используют для повышения высеваемости сальмонелл из пищевых продуктов. Соотношение массы продукта и среды 1:9. Посевы инкубируют при 37⁰С в течение 18-20 часов, затем 10 см³ среды обогащения засевают в 90 см³ магниевой или селениновой среды. Инкубируют 37⁰С в течение 18-20 часов. Культуру пересевают на висмут-сульфитный агар (ВСА). Инкубируют при 37⁰С в течение 18-20 часов. На ВСА отмечают рост колоний характерных для сальмонелл: черных с металлическим блеском, иногда нежно-зелёного цвета. Для подтверждения принадлежности выделенных микроорганизмов к роду *Salmonella* осуществляют микроскопию, изучение биохимических и антигенных свойств.

Задание 2. Определить микроорганизмы порчи: дрожжи и плесневые грибы.

1 см³ нативного образца, 1 см³ из разведений образца 1:10 или 1 см³ из разведений продукта 1:100 высевает на 2 чашки Петри. В каждую чашку добавляют 14,0 см³ расплавленной и охлажденной до 40-45⁰С среды Сабуро. Содержимое тщательно перемешивают, дают застыть. Инкубируют вверх дном при 24⁰С в течение 5 суток (120 часов). Проводят подсчет колоний на каждой чашке отдельно. Колонии дрожжей и плесневых грибов разделяют визуально, при необходимости проводят микроскопическое исследование.

Типичные колонии дрожжей: крупные, выпуклые, блестящие, серовато-белые или беловато-жёлтые, с гладкой поверхностью и ровным краем, сметанообразной консистенции; могут иметь перламутровый оттенок и куполообразное возвышение.

Типичные колонии плесневых грибов: имеют поверхность, покрытую пушистым мицелием, похожим на вату.

Задание 3. Определить общее микробное число (количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ)).

Общее микробное число (ОМЧ) - число всех микроорганизмов в 1 мл или в 1 г изучаемого объекта, выражаемого в колониеобразующих единицах (КОЕ). При определении ОМЧ исходят из предположения, что чем больше микроорганизмов обнаружено во внешней среде, тем вероятнее загрязнение патогенными микроорганизмами. В связи с этим, ОМЧ даёт представление о санитарном благополучии объекта.

Из исследуемого материала готовят ряд последовательных разведений в стерильной водопроводной воде или 0,85%-ном растворе NaCl. Для приготовления разведений

стерильную водопроводную воду разливают по 9 мл в стерильные сухие пробирки. Затем 1 мл исследуемого материала стерильной пипеткой добавляют в первую пробирку с водой и получают его разведение 10^{-1} , тщательно перемешивают, отбирают новой пипеткой 1 мл и переносят во вторую пробирку, получая второе разведение (10^{-2}). Таким же образом готовят последующие разведения. Затем осуществляют посев, внося в стерильные чашки Петри, слегка приоткрывая крышки, по 1 мл из соответствующего разведения. В каждую чашку вливают 8-12 мл расплавленного и остуженного до $45-49^{\circ}\text{C}$ 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 застывания агара, чашки помещают в термостат вверх дном и инкубируют при температуре 37°C в течение 24 ± 2 часов. Колонии микроорганизмов в зависимости от скорости

роста подсчитывают через 1-5 суток инкубации. Учет результатов осуществляют путём подсчёта всех выросших колоний, как правило, не открывая чашек Петри. Для удобства каждую просчитанную колонию отмечают точкой на наружной стороне дна чашки. При большом количестве колоний дно чашки Петри делят на секторы, просчитывают колонии в каждом секторе и суммируют результаты.

Лучшим разведением следует считать то, из которого при высеве в чашке Петри вырастает от 30-50 до 100-150 колоний. Если число выросших колоний меньше 10, то эти результаты для расчета количества клеток в исходном исследуем материале не используют.

Результаты параллельных высевок из одного и того же разведения суммируют и определяют среднее число колоний, выросших при высеве из разведения на одной чашке. Результат выражают числом КОЕ в 1 см^3 или 1 г исследуемой пробы.

По окончании лабораторной работы проанализировать полученные результаты.

2.3.Лабораторная работа № 3-4 (4 часа).

Тема: «Микробиологический анализ мяса и мясных продуктов»

2.3.1 Цель работы: изучить методы оценки микробиологической безопасности сырого мяса и готовых кулинарных изделий из мяса.

2.3.2 Задачи работы:

1. Изучить микрофлору мяса и определить его качество.
2. Определить наличие анаэробов в мясе.
3. В целях контроля технологии производства котлет в студенческой столовой необходимо провести бактериологическое исследование жареной котлеты. Определить микробное число, наличие в пробе кишечной палочки и патогенного стафилококка.

2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Пробы сырого мяса,пробы котлет,стерильные пробирки с пробками, стерильный изотонический раствор хлорида натрия, чашки Петри, МПА, ЖСА, среда Эндо, солевой бульон, среда Кесслера, плазма крови кролика в пробирках, предметные стекла, МПА, , набор красителей для окраски по Граму, предметные стекла, спиртовки, микроскопы, смесь спирта с эфиром, фуксин, стерильные шпатели, скальпели, ножницы, иммерсионное масло, дезинфицирующий раствор, весы, термостат.

2.3.4 Описание (ход) работы:

Мясо здорового животного обычно стерильно, так как в физиологических условиях стенка кишечника непроницаема для микроорганизмов. Утомление, длительное голодание и болезни животных, предназначенных к убою, предопределяют нарушение функционирования физиологических барьеров и проникновение микроорганизмов из

кишечного тракта через кровеносную и лимфатическую системы в органы и ткани животных, что приводит к прижизненному эндогенному обсеменению.

Посмертное обсеменение туши, связанное с попаданием микроорганизмов из окружающей среды, называют экзогенным. Мясо может обсеменяться микроорганизмами после убоя животного при первичной обработке и разделке туш (особенно в случаях повреждения кишечника), с инструментов, рук и одежды рабочих, а также при транспортировании, хранении, разрубке в магазинах и др. Поэтому даже свежесвыработанное мясо не стерильно – в нём (преимущественно на поверхности) содержатся микроорганизмы.

Для многих микроорганизмов мясо служит хорошим питательным субстратом, в котором они находят все необходимые для себя вещества – источники углерода, азота, витаминов, минеральных солей.

Обсеменённость свежесвыработанного охлаждённого мяса микроорганизмами может быть различной в зависимости от степени созревания мяса, температурно-влажностного режима, охлаждения, санитарно-гигиенических условий выработки и др. На 1 см² поверхности насчитывают тысячи, десятки и сотни тысяч клеток. Состав микрофлоры разнообразен: преобладают аэробные и факультативно-анаэробные, бесспорные, грамотрицательные палочковидные бактерии родов *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Proteus*, БГКП, коринеформные бактерии, молочнокислые микрококки. В меньших количествах обнаруживают аэробные и анаэробные спорообразующие бактерии, дрожжи, споры плесеней. Среди этих микроорганизмов немало возможных возбудителей порчи мяса, способных активно воздействовать на белки, жир и другие вещества, входящие в его состав.

Размножаясь при благоприятных условиях на поверхности мяса, микроорганизмы постепенно проникают в его толщу. Проникновение бактерий в глубину мяса сопровождается снижением его качества. На этом основано бактериоскопическое исследование мяса, позволяющее быстро установить его свежесть, и выбрать метод проведения анализа в зависимости от бактериальной обсеменённости пробы и морфологии присутствующих в ней микроорганизмов (палочки, кокки, биполярноокрашенные микроорганизмы, капсульные или споровые формы и т.д.) (ГОСТ 23392-78).

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 микроорганизмов. 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 микроорганизмов, 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 50⁰С МПА. Вращают пробирку между ладонями для того, чтобы кусочек мяса осел на дно пробирки.

Пробирки помещают в термостат при 40⁰С, через 3-4 дня их 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.

Задание 3. В целях контроля технологии производства котлет в студенческой столовой необходимо провести бактериологическое исследование жареной котлеты. Определить микробное число, наличие в пробе кишечной палочки и патогенного стафилококка.

Из внутренней части котлеты приготавливают навеску массой 10,0 г. Эмульгируют в ступке с 90,0 мл физиологического раствора (разведение 1:10). Для определения общего микробного числа делают посев на три чашки: по 1 мл эмульсии заливают 14 мл расплавленного и остуженного до 45⁰С МПА; одновременно по 10,0 мл эмульсии засевают на среды накопления: для определения кишечной палочки - на среду Кесслера; для определения патогенного стафилококка - на солевой бульон (МПБ с добавлением 6% NaCl). Посевы помещают в термостат на 24 часа при 37⁰С.

При наличии признаков роста, проводят пересев со сред накопления на дифференциально-диагностические среды: со среды Кесслера пересевают на среду Эндо; с солевого МПБ - в плазму крови кролика и на желточно-солевой агар.

Учет результатов. Определяют общее количество микроорганизмов в 1 г. Для этого подсчитывают и суммируют количество колоний, выросших на трёх чашках с МПА, находят среднее арифметическое и умножают на степень разведения (на 10).

При наличии на среде Эндо колоний, характерных для группы кишечной палочки, готовят препарат, окрашивают по Граму. Наличие грамтрицательных палочек подтверждает присутствие в пробах БГКП.

Наличие лецитовителлазы и плазмокоагулазы у выделенного стафилококка свидетельствует о его патогенности.

Примечание. При бактериологическом исследовании жареной котлеты (внутренняя часть) кишечная палочка и патогенный стафилококк должны отсутствовать. Микробное число не должно превышать 1000 КОЕ в 1 г продукта.

2.4 Лабораторная работа № 5-6 (4 часа).

Тема: «Микробиологический анализ рыбы»

2.4.1 Цель работы: провести санитарно-микробиологическое исследование охлаждённой рыбы из торговой сети.

2.4.2 Задачи работы:

В целях контроля качества охлаждённой рыбы, реализуемой на рынке, необходимо провести бактериологическое исследование: определить общее микробное число, наличие в пробе кишечной палочки и патогенного стафилококка.

2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Пробы рыбы охлаждённой, стерильные пробирки с пробками, ступки с пестиками, стерильный изотонический раствор хлорида натрия, чашки Петри, МПА, ЖСА, среда Эндо, солевой бульон, среда Кесслера, плазма крови кролика в пробирках, предметные стекла, спиртовки, микроскопы, набор красителей для окраски по Граму, стерильные шпатели, скальпели, ножницы, иммерсионное масло, дезинфицирующий раствор, весы, термостат.

2.4.4 Описание (ход) работы:

Работа

Задание. В целях контроля качества охлаждённой рыбы, реализуемой на рынке, необходимо провести бактериологическое исследование: определить общее микробное число, наличие в пробе кишечной палочки и патогенного стафилококка.

Из мышц около головы и позвоночника (наиболее вероятные места скопления микроорганизмов) охлаждённой рыбы готовят навеску массой 10,0 г и эмульгируют в ступке с 90,0 мл физиологического раствора (разведение 1:10). Затем готовят ряд последовательных десятикратных разведений до 10^{-4} . Для определения общего микробного числа делают посев на 3 чашки по 1 мл из разведения 10^{-3} . Заливают 14 мл расплавленного и остуженного до 45°C МПА, инкубируют 24 часа при 37°C .

Эмульсии сеют по 10,0 мл на среды накопления: для определения кишечной палочки - 10 мл 4-ого разведения (1:10000) на среду Кесслера; для определения патогенного стафилококка - 10 мл 3-го разведения (1:1000) на солевой бульон. Посевы помещают в термостат на 24 часа при 37°C .

При наличии признаков роста проводят пересев со сред накопления на дифференциально-диагностические среды: со среды Кесслера пересевают на среду Эндо; с солевого МПБ - в плазму крови кролика, на желточно-солевой агар.

Учет результатов. Для определения общего микробного числа подсчитывают общее количество микроорганизмов в 1 г, т.е. число колоний на трёх чашках с МПА суммируют, делят на 3 и умножают на степень разведения (10^3).

При наличии на среде Эндо колоний, характерных для группы кишечной палочки, готовят препарат, окрашивают по Граму. Наличие грамотрицательных палочек подтверждает присутствие в пробах бактерий группы кишечной палочки.

Наличие лецитовителлазы и плазмокоагулазы у выделенного стафилококка свидетельствует о его патогенности.

Примечание. При бактериологическом исследовании охлаждённой рыбы БГКП должны отсутствовать в 0,001 г, патогенный стафилококк в 0,01 г продукта. Микробное число не должно превышать $1 \cdot 10^5$ КОЕ в 1 г продукта.

2.5 Лабораторная работа № 7-8 (4 часа).

Тема: «Микробиологический анализ молока и молочных продуктов»

2.5.1 Цель работы: Изучить санитарную оценку молока; изучить принцип санитарно-микробиологического исследования кисломолочных продуктов.

2.5.2 Задачи работы:

1. Провести редуктазную пробу.
2. Определить общее количество бактерий в молоке.
3. Определить титр кишечной палочки.
4. Изучить микрофлору сыра.
5. Определить наличие микроорганизмов порчи в кефире.

2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Пробы молока, пробы кефира и творога, 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, стерильная вода, чашки Петри со средой Эндо, 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.

2.5.4 Описание (ход) работы:

Работа

Задание 1. Провести редуктазную пробу.

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

Задание 2. Определить общее количество бактерий в молоке.

Вначале готовят разведения (10^{-1} – 10^{-5}), для чего из отобранной пробы стерильной пипеткой берут 1 мл молока и переносят в пробирку, содержащую 9 мл стерильной воды. Содержимое пробирки взбалтывают 1 минуту и, таким образом, получают разведение 10^{-1} . 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 минут, делают посев из разведений 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Чашки Петри с посевом помещают в термостат при 37°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°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 более чем в одной пробирке с 0,1 мл коли-титр равен 0,3 мл; при образовании газа в шести или пяти пробирках коли-титр менее 3,0 мл (такое молоко непригодно к употреблению).

В связи с тем, что в пробах молока могут быть другие бактерии, сбрасывающие 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°C характерных колоний красного цвета с металлическим оттенком указывает на наличие кишечной палочки. Из колоний готовят мазки, окрашивают по Граму. Наличие грамтрицательных палочек свидетельствует о присутствии бактерий группы кишечной палочки в данной пробе.

Задание 4. 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 5. Определить наличие микроорганизмов порчи в кефире.

Для выявления микроорганизмов 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.

2.6 Лабораторная работа № 9 (2 часа).

Тема: «Микробиологический анализ яиц»

2.6.1 Цель работы: изучить принцип санитарно-микробиологического исследования яиц.

2.6.2 Задачи работы:

1. Провести пробоподготовку яиц куриных столовых для санитарно-микробиологического исследования.
2. Определить КМАФАнМ в столовом курином яйце.
3. Определить наличие БГКП в содержимом яйца.
4. Определить наличие *Salmonellasp.* в содержимом яйца.

2.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Яйца, стерильные среды: МПА, висмут-сульфитный агар, среда Эндо, среда Клиглера, стерильные чашки Петри, пипетки, пробирки, стерильный изотонический раствор хлорида натрия, спиртовые горелки, термостат.

2.6.4 Описание (ход) работы:

Работа.

Задание 1. Провести пробоподготовку яиц куриных столовых для санитарно-микробиологического исследования.

Перед микробиологическим исследованием содержимого яиц поверхность скорлупы обмывают теплым 0,2%-ным раствором каустической соды или 0,5%-ным раствором кальцинированной соды в течение 2 минут. После мойки яйцо ополаскивают водопроводной водой, дают стечь и погружают в 70%-ный спирт на 10 минут, после чего обжигают в пламени.

На остром конце яйца делают отверстие диаметром около 1 см и снова обжигают. Содержимое одного или нескольких яиц выливают в колбу и гомогенизируют с помощью бус или пипеток до однородной консистенции. Исследование проводят сразу, для этого 10

мл яичной массы переносят в колбу, содержащую 90 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия (исходное разведение 1:10), из которого переносят 1 мл в пробирку с 9 мл физиологического раствора, получая разведение 1:100, 1:1000 и так далее до нужного конечного разведения.

Микробиологическое исследование содержимого яиц сводится к определению КМАФАнМ, выявлению БГКП, золотистого стафилококка, протей, сальмонелл и в некоторых случаях *B. cereus*.

Задание 2. Определить КМАФАнМ в столовом курином яйце.

Для определения КМАФАнМ(КОЕ/г или КОЕ/мл) по 1 мл полученных разведений вносят параллельно в чашки Петри (по две чашки на каждое разведение) и заливают расплавленным и охлажденным до температуры 50⁰С МПА. Тщательно перемешивают и после застывания инкубируют при температуре 30⁰С в течение 72 часов. Подсчитывают все выросшие колонии. По результатам подсчета определяют среднее арифметическое значение числа колоний из всех посевов одного разведения.

Количество КОЕ в 1 г яичных продуктов определяют по формуле

$$x=a \cdot 10^n/V,$$

где *a* — среднее арифметическое число колоний в чашке; *n* — степень 10-кратного разведения продукта; *V*— объем посевного материала, внесенного в чашку.

Задание 3. Определить наличие БГКП в содержимом яйца.

Для выявления БГКП проводят посев по 1 мл натурального продукта и из разведений 1:10, 1:100 в среду Кесслера в соотношении объема засеваемого продукта и среды 1:10. Посевы культивируют 24 часа в термостате при температуре 37⁰С. Из пробирок с признаками роста делают посев на среду Эндо и выдерживают 24 часа при температуре 37⁰С. Затем посевы просматривают и отмечают рост колоний, характерных для БГКП. Не менее чем из трех характерных колоний готовят препараты, окрашивают их по Граму и микроскопируют. Результаты оценивают по каждой пробе отдельно. Обнаружение на среде Эндо колоний с характерными признаками роста, наличие в мазках грамтрицательных палочек, сбраживающих лактозу, указывает на присутствие в продукте БГКП.

Задание 4. Определить наличие *Salmonellasp.* в содержимом яйца.

Для индикации сальмонелл 25 мл натурального продукта вносят в колбу, содержащую 225 мл среды обогащения (Кауфмана, магниевой или селенитовой), встряхивают, термостатируют при температуре 37⁰С в течение 20 часов. Затем из среды обогащения бактериологической петлей проводят высев в чашки Петри с ВСА, выдерживают в термостате 48 часов. Из типичных для сальмонелл колоний выбирают не меньше трех, переносят их в пробирки с МПА, МПБ и на дифференциальную среду Крумвиде-Олькеницкого или Клигlera, которые засевают штрихом на скошенную поверхность, а затем уколом в глубину столбика. Посевы инкубируют в термостате при температуре 37⁰С в течение 24 часов.

Выросшие колонии с поверхности дифференциальных сред используют для постановки РА и приготовления мазков.

Показатели микробиологического анализа оценивают в соответствии с СанПиН 2.3.2.1078-01 «Продовольственное сырьё и пищевые продукты. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы».

2.7 Лабораторная работа № 10-11 (2 часа).

Тема: «Микробиологический анализ фруктов»

2.7.1 Цель работы: изучить методы санитарно-микробиологической оценки фруктов.

2.7.2 Задачи работы:

1. Изучить микрофлору фруктов, оценить их качество.
2. Определить количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.
3. Определить наличие БГКП.
4. Определить наличие бактерий рода *Salmonella*.
5. Определить количество дрожжей и плесневых грибов

2.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Пробы фруктов, стерильные чашки Петри, стерильные пробирки, пипетки, МПА, Сабуро, висмут-сульфит агар, среда Эндо, предметные и покровные стекла, спиртовки, микроскопы, набор для окраски по Граму, микробиологические иглы, стерильные шпатели, иммерсионное масло, термостат.

2.7.4 Описание (ход) работы:

Работа

Задание 1. Изучить микрофлору фруктов, оценить их качество.

Для определения бактериологической зараженности фруктов используется метод смывов. Навеску фруктов в 500,0 граммов помещают в стерильную широкогорлую банку и заливают 500,0 мл физиологического раствора. Пробу тщательно перемешивают, взбалтывают в течение 10 мин, затем навеску фруктов удаляют из банки стерильным пинцетом, а смыву дают отстояться от грубых взвешенных частиц. 1 мл смыва стерильной пипеткой переносят в пробирку, содержащую 9 мл стерильной воды, и готовят разведения 10^{-2} - 10^{-5} . При микробиологическом исследовании фруктов и ягод определению подлежат следующие показатели: общее микробное число (КОЕ/г), БГКП, патогенные микроорганизмы, в том числе *Salmonella* spp., дрожжи и плесени.

Задание 2. Определить количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. По 1 см³ из разведений 10^{-2} и 10^{-3} из каждой пробы высевают параллельно в две чашки Петри для каждого разведения. Затем по 20 см³ предварительно расплавленной и охлажденной до 45⁰С МПА. Сразу после заливки МПА содержимое чашки Петри тщательно перемешивают путем легкого вращательного покачивания для равномерного распределения посевного материала. После застывания агара чашки Петри переворачивают крышками вниз и ставят в термостат при температуре 30⁰С на 72 часа.

Количество выросших колоний подсчитывают на каждой чашке, поместив ее вверх дном на темном фоне, и пользуясь лупой с увеличением в 4-10 раз. При большом числе колоний дно чашки делят на 4 и более одинаковых секторов, подсчитывают число колоний на 2-3-х секторах, находят среднее арифметическое и умножают на общее количество секторов всей чашки. Таким образом, находят общее количество колоний, выросших на одной чашке, и вычисляют общее количество бактерий в 1,0 см³ или 1,0 г продукта по следующей формуле:

$$X = n \cdot x \cdot 10^m, \text{ где}$$

X - общее количество бактерий в 1,0 см³ или 1,0 г продукта; n- число колоний, подсчитанных на чашке Петри; m - число десятикратных разведений.

Задание 3. Определить БГКП. По 1 см³ из разведений 10^{-1} и 10^{-2} высевают на чашки со средой Эндо. При этом посев выполняют петлей так, чтобы получить рост изолированных колоний. Посевы инкубируют при температуре 37⁰С в течение 18-24 ч. При отсутствии на среде Эндо колоний, типичных для БГКП - крупные с металлическим

блеском или без него, розовые или бледно-розовые колонии, засеянная навеска продукта считается незагрязненной, т.е. исследуемый продукт соответствует нормативу на БГКП. При наличии на среде Эндо типичных или подозрительных колоний продолжают их изучение. Для этого из изолированных колоний делают мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют. Обнаружение в мазке грамотрицательных палочек, не содержащих спор, указывает на наличие БГКП в анализируемой массе продукта и несоответствие микробиологическому нормативу.

Исследуемый продукт считается соответствующим нормативу на БГКП при подтверждении принадлежности подозрительных колоний к роду *Erwinia* и отсутствии других микроорганизмов, типичных для БГКП.

Для определения принадлежности к роду *Erwinia* типичные колонии, выросшие на среде Эндо пересевают на питательный агар с 5% сахарозой, на котором бактерии рода *Erwinia* дают выраженный мукоидный рост, не свойственный колиформным бактериям.

Задание 4. Определить бактерии рода *Salmonella*. Для посева используют 25 г продукта. Навеску продукта помещают в буфер, учитывая соотношение 1:10, после чего 1,0 см³ переносят на чашку с висмут-сульфит агаром. Посевы инкубируют при 30°C в течение 24 часов.

Типичные колонии сальмонелл на висмут-сульфитном агаре - черные, с характерным металлическим блеском, зеленоватые с темным ободком, при этом наблюдается окрашивание черной цвет участка среды под колонией.

При отсутствии типичных колоний сальмонелл результат анализа считают «отрицательным», т. е. в исследуемой массе продукта сальмонелл нет.

2.8 Лабораторная работа № 12-13 (4 часа).

Тема: «Микробиологический анализ овощей»

2.8.1 Цель работы: изучить методы санитарно-микробиологической оценки овощей.

2.8.2 Задачи работы:

1. Изучить микрофлору овощей, оценить их качество.
2. Определить количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.
3. Определить наличие БГКП.
4. Определить наличие бактерий рода *Salmonella*.
5. Определить количество дрожжей и плесневых грибов

2.8.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Пробы овощей, стерильные чашки Петри, стерильные пробирки, пипетки, МПА, Сабура, висмут-сульфит агар, среда Эндо, предметные и покровные стекла, спиртовки, микроскопы, набор для окраски по Граму, микробиологические иглы, стерильные шпатели, иммерсионное масло, термостат.

2.8.4 Описание (ход) работы:

Задание 1. Изучить микрофлору овощей, оценить их качество.

Для определения бактериологической зараженности овощей используется метод смывов. Навеску фруктов в 500,0 граммов помещают в стерильную широкогорлую банку и заливают 500,0 мл физиологического раствора. Пробу тщательно перемешивают, взбалтывают в течение 10 мин, затем навеску овощей удаляют из банки стерильным пинцетом, а смыву дают отстояться от грубых взвешенных частиц. 1 мл смыва стерильной пипеткой переносят в пробирку, содержащую 9 мл стерильной воды, и готовят разведения 10⁻²-10⁻⁵. При микробиологическом исследовании овощей определению подлежат следующие показатели: общее микробное число (КОЕ/г), БГКП, патогенные

микроорганизмы, в том числе *Salmonella* spp., дрожжи и плесени.

Задание 2. Определить количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. По 1 см³ из разведений 10⁻² и 10⁻³ из каждой пробы высевают параллельно в две чашки Петри для каждого разведения. Затем по 20 см³ предварительно расплавленной и охлажденной до 45⁰С МПА. Сразу после заливки МПА содержимое чашки Петри тщательно перемешивают путем легкого вращательного покачивания для равномерного распределения посевного материала. После застывания агара чашки Петри переворачивают крышками вниз и ставят в термостат при температуре 30⁰С на 72 часа.

Количество выросших колоний подсчитывают на каждой чашке, поместив ее вверх дном на темном фоне, и пользуясь лупой с увеличением в 4-10 раз. При большом числе колоний дно чашки делят на 4 и более одинаковых секторов, подсчитывают число колоний на 2-3-х секторах, находят среднее арифметическое и умножают на общее количество секторов всей чашки. Таким образом, находят общее количество колоний, выросших на одной чашке, и вычисляют общее количество бактерий в 1,0 см³ или 1,0 г продукта по следующей формуле:

$$X = n \cdot x \cdot 10^m, \text{ где}$$

X - общее количество бактерий в 1,0 см³ или 1,0 г продукта; n- число колоний, подсчитанных на чашке Петри; m - число десятикратных разведений.

Задание 3. Определить БГКП. По 1 см³ из разведений 10⁻¹ и 10⁻² высевают на чашки со средой Эндо. При этом посев выполняют петлей так, чтобы получить рост изолированных колоний. Посевы инкубируют при температуре 37⁰С в течение 18-24 ч. При отсутствии на среде Эндо колоний, типичных для БГКП - крупные с металлическим блеском или без него, розовые или бледно-розовые колонии, засеянная навеска продукта считается незагрязненной, т.е. исследуемый продукт соответствует нормативу на БГКП. При наличии на среде Эндо типичных или подозрительных колоний продолжают их изучение. Для этого из изолированных колоний делают мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют. Обнаружение в мазке грамотрицательных палочек, не содержащих спор, указывает на наличие БГКП в анализируемой массе продукта и несоответствие микробиологическому нормативу.

Исследуемый продукт считается соответствующим нормативу на БГКП при подтверждении принадлежности подозрительных колоний к роду *Erwinia* и отсутствию других микроорганизмов, типичных для БГКП.

Для определения принадлежности к роду *Erwinia* типичные колонии, выросшие на среде Эндо пересевают на питательный агар с 5% сахарозой, на котором бактерии рода *Erwinia* дают выраженный мукоидный рост, не свойственный колиформным бактериям.

Задание 4. Определить бактерии рода *Salmonella*. Для посева используют 25 г продукта. Навеску продукта помещают в буфер, учитывая соотношение 1:10, после чего 1,0 см³ переносят на чашку с висмут-сульфит агаром. Посевы инкубируют при 30⁰С в течение 24 часов.

Типичные колонии сальмонелл на висмут-сульфитном агаре - черные, с характерным металлическим блеском, зеленоватые с темным ободком, при этом наблюдается окрашивание черным цвет участка среды под колонией.

При отсутствии типичных колоний сальмонелл результат анализа считают «отрицательным», т. е. в исследуемой массе продукта сальмонелл нет.

2.9 Лабораторная работа № 14 (2 часа).

Тема: «Бактериологическая диагностика стафилококкового пищевого токсикоза»

2.9.1 Цель работы: изучить лабораторную диагностику стафилококкового пищевого токсикоза.

2.9.2 Задачи работы:

1. Приготовить мазки из культур стафилококков, окрасить их по Граму, промикроскопировать, зарисовать.
2. Описать культуральные свойства стафилококков.
3. Изучить ферментативные свойства стафилококков.
4. Результаты исследований занести в таблицу.

2.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Культуры *S.aureus* на МПА, кровяном МПА, ЖСА, в МПБ, результаты тестов на плазмокоагулазную активность, лецитиназную, набор красок для окраски по Граму, тест-системы для биохимической идентификации.

2.9.4 Описание (ход) работы:

Стафилококкозы - заболевания, встречающиеся у многих видов млекопитающих, в том числе и у человека. Патогенные стафилококки - вызывают гнойно-воспалительные процессы различной локализации: местные – фурункулы, абсцессы и др.; в отдельных органах – маститы, эндометриты и др.; общее поражение – пиемия и септицемия. пищевые токсикозы (токсикоинфекции). Род *Staphylococcus* входит в семейство *Micrococcaceae*. Данный род включает три вида: *St. aureus*, *St. epidermatis*, *St.saprophyticus*. Вместе с тем, сейчас уже известно ещё 10 видов стафилококка, которые пока не включены в официальную систематику. Это *St. xylosus*, *St. haemolyticus*, *St. cohnii*, *St. wameryi*, *St. cupitis*, *St. scinri*, *St. simulans*, *St .hominis*, *St. hyicus*, *St. intermedium*.

Материал для исследования: раневой экссудат, гной абсцессов, ран, молоко при маститах, выделение из половых органов при эндометритах, кровь при септицемии.

Микроскопия. Методы окраски: простой метод и по Граму; микрокартина: шаровидные клетки располагаются беспорядочно, диаметр 0,5-1,5 мкм; грамположительные; спор не образуют; капсулу не образуют (за исключением патогенных штаммов *S.aureus*), спор не образуют. Культивирование: посев на питательные среды: МПА, МПБ, МПА с 15% хлорида натрия, кровяной МПА, ЖСА, МЖСА.

Особенности выделения чистой культуры: факультативные анаэробы; оптимальная температура 37°C; срок культивирования 18-20 часов. Культуральные свойства: на МПА – колонии округлые, диаметром 2-5 мм, с ровным краем, могут быть окрашены в золотистый цвет (*S. aureus*), белый (*S. epidermidis*), лимонно-желтый (*S. saprophyticus*). На жидких средах: на МПБ – равномерное помутнение с выпадением рыхлого хлопьевидного осадка.

Биохимические свойства (ферментативная активность): ферментация маннита без газа (в анаэробных условиях); гемолиз на кровяных средах; ДНК – азная активность; рост на элективных средах; плазмокоагуляция. На ЖСА вокруг колоний стафилококков, обладающих лецитиназной активностью, образуются зоны помутнения с перламутровым оттенком.

Из культур, выросших на питательных средах, готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. При обнаружении бактерий с типичными для стафилококков культурально-морф-логическими признаками приступают к изучению свойств, прямо или косвенно свидетельствующих о патогенности выделенного стафилококка.

Патогенные стафилококки в отличие от непатогенных образуют капсулу (*S. aureus*), выделяет гемолизин, фибринолизин (стафилокиназу), гиалуронидазу, плазмокоагулазу, желатиназу, ДНК-азу, лецитиназу, ферментируют маннит. Важнейшим из перечисленных факторов считают плазмокоагулазу: у 90-95% плазмокоагулирующих стафилококков выражена способность продуцировать энтеротоксин.

Биопроба. Заражают лабораторных животных для подтверждения токсигенных свойств выделенного стафилококка. Летальный токсин выявляют внутривенным введением кролику фильтрата бульонной культуры 0,75 мл на 1 кг массы.

Некротоксин обнаруживают внутрикожной пробой. Готовят суспензию суточной культуры в физиологическом растворе с концентрацией клеток $4,2 \cdot 10^9$ /мл и $1 \cdot 10^9$ /мл. Каждое разведение культуры по 0,1 мл вводят внутрикожно кролику, предварительно удалив шерстный покров на месте инъекции. Результаты учитывают ежедневно на протяжении 4-5 сут. В положительных случаях развивается некроз кожи.

Энтеротоксин продуцируют токсигенные штаммы. Пробу на энтеротоксин ставят при отравлениях. Культуру стафилококка выращивают на специальной питательной среде (пептон, хлорид кальция, хлорид магния, дигидрофосфат калия, 0,8% агар-агара, pH 7,2), в атмосфере, содержащей 20% оксида углерода (IV), в течение трех суток. Затем культуру стерилизуют фильтрованием, 10-15 мл фильтрата смешивают с равным объемом молока и скармливают 4...8-недельным котяткам. При наличии энтеротоксина через 1-2 ч у животных возникают симптомы гастроэнтерита и рвота.

Биопроба для определения свойств: летальных – на кроликах; дерматонекротических – на кроликах; токсических – на котятках.

Серологическая диагностика не используется.

Работа.

Задание. Приготовить мазки из культур стафилококков, окрасить их по Граму, промикроскопировать, зарисовать. Описать культуральные свойства стафилококков. Изучить ферментативные свойства стафилококков. Результаты исследований занести в таблицу.

2.10 Лабораторная работа № 15 (2 часа).

Тема: «Бактериологическая диагностика пищевой токсикоинфекции, вызванной *B. cereus*»

2.10.1 Цель работы: изучить лабораторную диагностику пищевой токсикоинфекции, вызванной *B. cereus*.

2.10.2 Задачи работы:

1. Приготовить мазки из культур *B. cereus*, окрасить их по Граму, промикроскопировать, зарисовать.
2. Описать культуральные свойства *B. cereus*.
3. Изучить ферментативные свойства *B. cereus*.
4. Результаты исследований занести в таблицу.

2.10.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Культуры *B. cereus* на МПА, кровяном МПА, ЖСА, в МПБ, результаты тестов на плазмокоагулазную активность, лецитиназную, набор красок для окраски по Граму, тест-системы для биохимической идентификации.

2.10.4 Описание (ход) работы:

Температурный оптимум *B. cereus* составляет 30°C, но рост отмечается и в диапазоне температур +12-39°C (у 4% штаммов - +6-55°C). Оптимум pH лежит в области 7-9,5 (у 39% штаммов - в пределах 4-12). На питательном агаре *B. cereus* образует крупные, распластанные колонии серовато белого цвета с зернистой поверхностью и изрезанными краями. Клетка может синтезировать желтоватый, зелёный и оранжевый пигмент. На кровяном агаре колонии восковидные, перламутровые, с зоной гемолиза, в отличие от возбудителя сибирской язвы. На косом агаре колонии растут в виде восковидного налёта. На бульоне, в отличие от сибирской

язвы вызывает помутнение среды, редко с образованием хлопьев и нежной белой плёнки. Имеет устойчивость к 6,5% раствору натрия хлорида, но при возрастании концентрации соли до 10-15% рост прекращается.

Метаболизм протекает как по типу брожения, так и окисления. *B. cereus*-факультативный анаэроб, обладает многими протеолитическими свойствами: разжижает желатин, осуществляет гидролиз казеина до параказеина или пептона, слабо расщепляет глюкозу до кислоты без газа. По способности расщеплять лактозу, сахарозу, дульцит, глицерин, арабинозу, галактозу различают 12 биохимических вариантов. Другой обязательный признак - образование ацетилметилкарбинола. На среде Козера растут только 20% штаммов. Протеолиз (+) у 85% штаммов отмечается на 1-2 день, у остальных - на 3-4. Все штаммы створаживают молоко и переводят казеин в параказеин в течение 6 сут.

Все штаммы продуцируют лецитиназу. *B. cereus* продуцирует фермент пенициллиназу, детерминирующий резистентность к пенициллину и к полимиксину. Эти антибиотики добавляют в питательные среды для выделения возбудителя. Кроме того, микроорганизмы чувствительны к ристомичину, биомичину, канамицину, эритромицину, олеандомицину, левомицетину.

Отличительные признаки *B. cereus* от *B. anthracis*:

1. Подвижность (+).
2. Гемолиз бараньих эритроцитов на агаре (+).
3. Образование гомогенной мути на бульоне.
4. Быстрая пептонизация молока.
5. Быстрое и сильное разжижение желатина с образованием горизонтальных отростков.
6. Подщелачивание лакмусового молока.
7. Разложение молока с метиленовой синью.

От других бацилл отличается комплексом видовых признаков:

- подвижностью;
- окислением, ферментацией глюкозы (\pm);
- способностью к гемолизу (+);
- выделением лецитиназы (+);
- способностью разлагать маннит (-).

Более подробно дифференциальные признаки изложены в определителе бактерий Берджи.

Для *B. cereus* характерно наличие гемотоксина, лецитиназы, протеазы, гиалуронидазы. Вырабатываемый микробом энтеротоксин белковой природы (термолабильный, чувствительный к трипсину) вызывает воспаление слизистой оболочки кишечника. Микроорганизм относят к условно-патогенным.

Различные продукты могут служить причиной пищевых отравлений, вызванных *B. cereus* при индексе обсеменённости их 10^4 /г. В чернозёмной почве микроорганизм обнаруживают в 100% случаев, в фекалиях людей - в 0,5% случаев, в водопроводной воде - в 15% проб.

Инкубационный период пищевого отравления, вызванного *B. cereus*, составляет 10-14 ч, начинается внезапно и быстро заканчивается. Отмечается тошнота, рвота, коликообразные боли в животе, жидкий водянистый стул с тенезмами; в тяжёлых случаях повышается температура, но летальность низкая. Из фекалий больных возбудителя выделяют редко, не более чем в 14% случаев.

Бактериологическая диагностика.

Первый этап: бактериоскопия исходного материала (рвотные массы, промывные воды, фекалии, пищевые продукты) и посев исследуемого материала на плотные питательные среды для выделения возбудителя и определения его количества. Для этого пищевые продукты титруют на децепроцентной (0,1%) пептонной воде до 10^{-7} , фекалии, рвотные массы, промывные воды от 10^{-2} до 10^{-4} . Затем по 0,1 см³ засевают на плотные питательные среды: Пивоварова (ЖСА с полимиксином и ТТХ), Никодемуса (желточно-спиртовой агар) или Чистовича (ЖСА).

Температура инкубации составляет 37⁰С, но лучше 30⁰С. На среде Пивоварова учёт проводят через 48 ч, на средах Николемуса и ЖСА - через 72 ч. Затем вычисляют индекс возбудителя.

Второй этап: изучение характера роста. На среде Пивоварова колонии розовые (могут быть красные) за счёт редукции ТТХ, окружённые зоной лецитиназной активности. На средах Николемуса и Чистовича колонии цвета среды с зоной лецитиназного венчика вокруг колонии. После оценки роста 3-5 колоний пересевают на скошенный агар и параллельно на мясопептонный бульон, инкубируют при температуре 37⁰С в течение 24 ч.

Идентификация *B.cereus*.

Подвижность в раздавленной капле (+).

На среде Гисса с маннитом (-).

На среде Кларка за 48 часов образует ацетон, т.е. реакция Фогес- Проскауэра (+).

4. На кровяном агаре гемолиз (+).

5. Окисление, ферментация глюкозы (++).

6. Каталаза (+).

Для доказательства идентичности выделенной культуры из различных материалов определяют метки.

• Определение биоваров на среде Гисса:

- лактоза (+/-);
- сахароза (+/-);
- глицерин (-/), Различные сочетания дают 12 биоваров;
- галактоза (+/-);
- дульцит (+/-);
- арабиноза (+/-)

• Определение вирулентности: 500 КОЕ вводят внутрибрюшинно двум белым мышам массой 10-15 г. На 1-4 сутки мыши погибают, и в органах обнаруживается *B. cereus*. Этиологическую роль *B. cereus* при пищевых отравлениях можно признать (при отсутствии патогенных микроорганизмов) в следующих случаях, когда *B. cereus*:

1. Обнаружен в пищевых продуктах в количествах 10⁵/г (см³) или более.

2. Обнаружен одновременно в рвотных массах, промывных водах, испражнениях в количестве 100 КОЕ/г (см³) и более.

1. Выделен из фекалий у большинства пострадавших.

3. Выделен из фекалий больного только в остром периоде болезни в количестве 100-1000 КОЕ/г и более с последующим исчезновением микроорганизма после выздоровления.

2.11 Лабораторная работа № 16 (2 часа).

Тема: «Бактериологическая диагностика ботулизма»

2.11.1 Цель работы: изучить лабораторную диагностику ботулизма.

2.11.2 Задачи работы:

1. Промикроскопировать готовые мазки с *Clostridium botulinum*.
2. Приготовить мазки из культур *Clostridium spp.*, окрасить их по Граму, промикроскопировать, зарисовать.
3. Описать культуральные свойства *Clostridium spp.*.
4. Изучить ферментативные свойства *Clostridium spp.*.
5. Результаты исследований занести в таблицу.

2.11.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Культуры *C. perfringens*, выращенные на среде Кит-Тароцци, агаре Дейслера, антитоксические сыворотки для определения сероварианта *C. perfringens*.

2.11.4 Описание (ход) работы:

Возбудитель ботулизма - *Clostridium botulinum* - вызывает остропротекающий кормовой токсикоз. Болезнь развивается вследствие воздействия ботулинического токсина на организм, характеризуется поражением центральной нервной системы и сопровождается парезами двигательных мышц.

Материал для исследования: кусочки пораженных мышц, отечный экссудат, кровь, взятые тотчас после гибели животного

Микроскопия. В мазках, окрашенных по Граму наблюдаются палочки с закругленными концами длиной 4-9 и ширине 0,6-0,8 мкм, располагающиеся одиночно или парами; грамположительные, полиморфные; образуют споры, располагающиеся субтерминально, редко центрально; капсулу не образуют; подвижны.

Культивирование. В среде Китта-Тароцци на глюкозо-кровяном агаре в чашках (агарЦейсслера). Особенности выделения возбудителя: строгий анаэроб; оптимальная температура 37°C; срок культивирования 48-74 часа;

Культуральные свойства. На кровяном МПА – колонии крупные с корневидными отростками и зоной гемолиза; на жидких средах – помутнение среды с газообразованием, характерный запах прогорклого масла.

Биопроба: метод применяют для обнаружения токсина в исследуемом материале или для определения токсигенных свойств выделенной культуры возбудителя. *C. botulinum* продуцирует токсины семи типов: А, В, С, D, Е, F, G, (у типа А самый сильный токсин). Ботулинический токсин отличается наибольшей токсичностью из всех известных микробных экзотоксинов (0,035 мг сухого порошка токсина является смертельной дозой для человека).

Все семь сероваров экзотоксина иммунологически специфичны, что выявляют в реакции нейтрализации.

Для обнаружения токсина исследуемый материал (20...30 г) растирают в физиологическом растворе (в соотношении 1:2), экстрагируют при комнатной температуре 2 ч, фильтруют через вату и делят на две части, одну часть прогревают при 100°C 20-30 мин. Затем нативным и прогретым фильтратом заражают внутривенно или внутрибрюшинно двух белых мышей. Морских свинок заражают подкожно по 3...5 мл. При наличии ботулинического токсина животные, которым введен кипяченый фильтрат, остаются живыми, нативный — погибают на 2-5-е сутки с характерной клиникой ботулизма: шаткая походка, учащенное дыхание, расслабление скелетной мускулатуры, западание брюшной стенки («осиная талия»).

При обнаружении в исследуемом материале токсина проводят его идентификацию. Для этого смешивают по 0,2 мл различных антисывороток в одной пробирке (А, В, С, D, Е), добавляют 1 мл экстракта, выдерживают 45 мин при 35-37°C и вводят внутрибрюшинно двум белым мышам. Контрольным животным вводят смесь фильтрата с физиологическим раствором. При выживании мышей, зараженных смесью фильтрата и сыворотки, и при гибели контрольных токсин идентифицируют как ботулинический. Этот результат служит достаточным основанием для постановки положительного диагноза на ботулизм. При необходимости определяют тип токсина в РН: смешивают по 2,4 мл фильтрата и 0,6 мл типовых сывороток, выдерживают в термостате и ставят биопробу на мышах, как было описано выше.