

**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: 36.03.01 Ветеринарно-санитарная экспертиза

Профиль образовательной программы: Ветеринарно-санитарная экспертиза

Форма обучения: заочная

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 Микробиологический анализ мяса и мясных продуктов.....	5
1.3.	Лабораторная работа № ЛР-3 Микробиологический анализ молока и молочных продуктов.....	6
1.4.	Лабораторная работа № ЛР-4 Микробиологический анализ яиц.....	8
1.5.	Лабораторная работа № ЛР-5 Микробиологический анализ фруктов.....	10
1.6.	Лабораторная работа № ЛР-6 Микробиологический анализ овощей.....	11

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, солевой бульон и желточно-солевой агар с культурой *S. aureus*, чашки с МПА с изолированными колониями, 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 массивное 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.

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 $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$ 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 43^0C . 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 37^0C 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 37^0C . 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 37^0C . 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 скоплений неправильной формы в виде виноградных кистей (результат характерного деления более чем в одной плоскости).

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 45-49⁰С 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 37⁰С 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 высеивании 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 исследуемом материале не используют.

Результаты параллельных высеиваний из одного и того же разведения суммируют и определяют среднее число колоний, выросших при высеивании на одной чашке. Результат выражают числом КОЕ в 1 см³ или 1 г исследуемой пробы.

По окончании лабораторной работы проанализировать полученные результаты.

2.2 Лабораторная работа № 2 (2 часа).

Тема: «Микробиологический анализ мяса и мясных продуктов»

2.2.1 Цель работы: изучить методы оценки микробиологической безопасности готовых кулинарных изделий из мяса.

2.2.2 Задачи работы:

1. 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.

2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

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.

2.2.4 Описание (ход) работы:

Задание 1. 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 грамотрицательных палочек подтверждает присутствие в пробах БГКП.

Наличие лецитовителазы и плазмокоагулязы 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.

2.3 Лабораторная работа № 3 (2 часа).

Тема: «Микробиологический анализ молока и молочных продуктов»

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

2.3.2 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.

2.3.3 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.

2.3.4 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 38-40⁰С. После перемешивания, содержимое пробирки помещают на водяную баню при 40⁰С (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, 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°C характерных колоний красного цвета с металлическим оттенком указывает на наличие кишечной палочки. Из колоний готовят мазки, окрашивают по Граму. Наличие грамотрицательных 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 подготовленный 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.

2.4 Лабораторная работа № 4 (2 часа).

Тема: «Микробиологический анализ яиц»

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

2.4.2 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.

2.4.3 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.

2.4.4 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, протея, 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 объёма засеваемого продукта и среды 1:10. Посевы культивируют 24 часа в термостате при температуре 37°C. Из пробирок с признаками роста делают посев на среду Эндо и выдерживают 24 часа при температуре 37°C. 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 грамотрицательных палочек, сбраживающих лактозу, указывает на присутствие в продукте БГКП.

Задание 4. Определить наличие *Salmonellas* 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 37°C в течение 20 часов. Затем из среды обогащения бактериологической петлей проводят высеv 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 Клиглера, которые засевают штрихом на скошенную поверхность, а затем уколом в глубину столбика. Посевы инкубируют в термостате при температуре 37°C 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».

2.5 Лабораторная работа № 5 (2 часа).

Тема: «Микробиологический анализ фруктов»

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

2.5.2 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

2.5.3 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, микологические иглы, стерильные шпатели, иммерсионное масло, термостат.

2.5.4 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 *Salmonellaspp.*, 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 мукOIDНЫЙ 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-сульфитом 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 черный цвет участка среды под колонией.

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

По окончании опыта проанализировать полученные результаты, сравнить с СанПиН и на основании проведенного бактериологического анализа сделать заключение о качестве фруктов.

2.6 Лабораторная работа № 6 (2 часа).

Тема: «Микробиологический анализ овощей»

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

2.6.2 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.

2.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

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

2.6.4 Описание (ход) работы:

Задание 1. Изучить микрофлору овощей, оценить их качество.

Для определения бактериологической зараженности овощей используется метод смызов. 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 *Salmonellaspp.*, 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 высеваю 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 высеваются на чашки со средой Эндо. При этом посевы выполняют петлей так, чтобы получить рост изолированных колоний. Посевы инкубируют при температуре 37°C 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 черный цвет участка среды под колонией.

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

Задание 5. Определить количество дрожжей и плесневых грибов. Из каждой пробы делают высевы по 1,0 см³ из разведений продукта 1:10 и 1:100 высеваются на 2 чашки Петри со средой Сабуро. Через 20 мин в каждую чашку добавляют 14,0 см³ расплавленной и охлажденной до 40-45°C среды, добавляют антибиотики содержимое тщательно перемешивают, дают застыть. Инкубируют вверх дном при 24°C в течение 5 суток. При учете посевов проводят подсчет типичных колоний на каждой чашке отдельно. Колонии дрожжей и плесневых грибов разделяют визуально, при необходимости проводят микроскопическое исследование. По окончании опыта проанализировать полученные результаты, сравнить с СанПиН и на основании проведенного бактериологического анализа сделать заключение о качестве овощей.