

Министерство сельского хозяйства РФ
ФГБОУ ВО «Брянский государственный
аграрный университет»

Институт ветеринарной медицины и биотехнологии

Кафедра эпизоотологии, микробиологии, паразитологии и
ветеринарно-санитарной экспертизы

Кафедра кормления животных и частной зоотехнии

ОБЩАЯ САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

учебно-методическое пособие
для проведения лабораторных занятий студентами
по направлению 19.03.03 «Продукты питания животного происхождения»
профиль «Технология мяса и мясных продуктов»



Брянск 2015

УДК 579(07)

ББК 28.4

Р 98

Рябичева, А.Е. **Общая санитарная микробиология:** учебно-методическое пособие / А.Е. Рябичева, И.В. Малявко. – Брянск: Изд-во Брянской ГСХА, 2015. - 99 с.

Учебно-методическое пособие подготовлено в соответствии с типовой учебной программой по изучению дисциплины «Общая санитарная микробиология» для проведения лабораторных занятий студентами, обучающимися по направлению 19.03.03 «Продукты питания животного происхождения» профиль «Технология мяса и мясных продуктов».

Рецензент: Сидоров И.И., директор федерального государственного бюджетного учреждения «Брянская межобластная ветеринарная лаборатория», кандидат биологических наук.

Рекомендовано к изданию решением методической комиссии института ветеринарной медицины и биотехнологии «Брянского ГАУ» от _____ г. протокол № ____.

© Брянский ГАУ, 2015

© Рябичева А.Е., 2015

© Малявко И.В., 2015

СОДЕРЖАНИЕ

Введение

Занятие 1. Санитарно-микробиологическое исследование почвы, воды, воздуха.

Занятие 2. Санитарно-микробиологическое исследование грубых кормов, силоса, сенажа, зерна.

Занятие 3. Санитарно-микробиологическое исследование навоза, шкур, шерсти

Занятие 4. Санитарно-микробиологическое исследование молока, масла.

Занятие 5. Санитарно-микробиологическое исследование кисломолочных продуктов.

Занятие 6. Санитарно-микробиологическое исследование сыров, молочных консервов, мороженого.

Занятие 7. Санитарно-микробиологическое исследование мяса и мясопродуктов

Занятие 8. Санитарно-микробиологическое исследование яиц

Занятие 9. Санитарно-микробиологическое исследование рыбы и рыбопродуктов.

Занятие 10. Санитарно-микробиологический контроль оборудования, инвентаря, тары, рук рабочих, вспомогательных материалов.

ВВЕДЕНИЕ

Микробиология (от греч. micros -малый, bios - жизнь, logos - учение) - наука, изучающая строение, жизнедеятельность и экологию микроорганизмов - мельчайших форм жизни растительного или животного происхождения, невидимых невооруженным глазом.

Санитарная микробиология занимается изучением микроорганизмов и процессов, вызываемых ими в окружающей среде.

Основной задачей санитарной микробиологии является предупреждение возникновения инфекционных заболеваний, т.е. осуществление постоянного контроля за водой, воздухом, почвой, пищевыми продуктами и т.д. с целью выявления патогенных микроорганизмов, либо выявление санитарно-показательных микроорганизмов, которые являются косвенными показателями зараженности окружающей среды.

Санитарно-показательные микроорганизмы — это постоянные обитатели поверхностей и полостей тела человека и животных, выделяющихся из организма теми же путями, что и патогенные. Поэтому, чем больше выявлено санитарно-показательных микроорганизмов, тем большая вероятность попадания в объекты внешней среды патогенных микроорганизмов.

Для каждого объекта внешней среды имеются определенные санитарно-показательные микроорганизмы — критерии оценки по бактериологическим показателям. Например, в отношении кишечных инфекций роль таких индикаторов принадлежит кишечным палочкам — постоянным обитателям кишечника человека и животных.

Санитарно-бактериологические исследования проводятся в строгом соответствии со специальными государственными стандартами, приказами, методическими рекомендациями, правилами, которые позволяют дать оценку соответствия выявленной в окружающей среде микрофлоры гигиеническим требованиям. В нормативных документах отражены правила отбора проб, количество материала, условия транспортировки, методы и цель исследования, а также критерии оценки полученных результатов.

В результате освоения дисциплины студент должен:

Знать:

- микрофлору сырья и продуктов животного происхождения (мяса и мясных изделий, птицы и продуктов из мяса птицы, яиц и яйцепродуктов, молока и молочных продуктов, рыбы и рыбных продуктов, баночных консервов, пресервов) ее качественную и количественную динамику в процессах производства, транспортировки, хранения и реализации;

- возбудителей, механизмы микробной порчи сырья и продуктов животного происхождения; способы профилактики микробной порчи;
- эпидемическое значение сырья и продуктов животного происхождения в возникновении различных инфекционных заболеваний человека, меры профилактики;
- микробиологические показатели безопасности сырья и продуктов животного происхождения в соответствии с научной документацией (НД) РФ, Таможенного Союза;
- современные научные разработки по использованию микроорганизмов в современных технологиях производства, перспективы и проблемы получения продуктов питания с заданными свойствами, хранения сырья и продуктов питания животного происхождения;

Уметь:

- использовать современные методы микробиологических исследований для оценки качества сырья и продуктов животного происхождения;
- осуществлять мониторинг качества сырья и продуктов животного происхождения по микробиологическим показателям безопасности в соответствии с НД;
- оценивать доброкачественность и эпидемиологическую безопасность сырья и продуктов животного происхождения на основе данных микробиологических исследований;
- знать и принимать меры профилактики по микробной контаминации сырья и продуктов животного происхождения;

Владеть:

- основными приемами и методами оценки показателей безопасности сырья и продуктов питания животного происхождения;
- методами, позволяющими дифференцировать признаки микробной порчи сырья и пищевых продуктов от физико-химических и естественных процессов;
- методами прогнозирования направленности и динамики микробиологической активности в сырье и продуктах в зависимости от конкретных условий;
- методами составления рекомендаций по режимам хранения, транспортировки сырья и пищевых продуктов.

ЗАНЯТИЕ 1

САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЧВЫ, ВОДЫ, ВОЗДУХА

Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения занятия: ПК-1 Способностью использовать нормативную и техническую документацию, регламенты, ветеринарные нормы и правила в производственном процессе;

ПК-5 Способностью организовывать входной контроль качества сырья и вспомогательных материалов, производственный контроль полуфабрикатов, параметров технологических процессов и контроль качества готовой продукции.

Цель занятия: ознакомить студентов с основными методами и показателями санитарно-микробиологической оценки состояния объектов окружающей среды

Формирование:

Знание: показателей санитарно-микробиологического исследования почвы, воды, воздуха.

Умение: применять знания санитарно-микробиологических исследований состояния объектов окружающей среды.

Владеть: методами определения общего количества микробов, наличия патогенных микроорганизмов, количества БГКП как показатель фекального загрязнения.

Материалы и оборудование: прибор для подсчета колоний; колбы с пробами воды, почвы, бактериологические пробирки с 9 мл воды, пробирки с 10 мл расплавленного агара, мерные стерильные пипетки (2 мл), стерильные чашки Петри, чашки Петри с МПА, чашки Петри с кровяным МПА, навески почвы, стерильная водопроводная вода в колбе (200 мл), пробирки со средами Кесслера, Вильсона-Блера, посуда лабораторная (чашки Петри, пробирки, пипетки – чаще всего на 2,0 мл).

Задание: 1. Определить микробное число воздуха: седиментационным методом (по Коху) — посев воздуха на мясопептонный агар и аспирационным методом (с помощью аппарата Кротова) — посев воздуха на мясопептонный агар, кровяной и молочно-желточно-солевой агар.

2. Определить микробное число воды: произвести взятие проб воды и сделать посев разведений исследуемой воды на мясопептонный агар.

3. Определить коли-титр воды бродильным методом (I этап).

4. Определить коли-индекс воды методом мембранных фильтров.

Содержание и методика работы

Микрофлора почвы и методы ее изучения

Почва служит благоприятной средой для развития и накопления многих видов бактерий, грибов, вирусов, простейших и представляет собой трехфазную систему, включающую почвенный воздух, почвенную влагу, минеральные и органические вещества. Вода и вещества, растворенные в ней, образуют почвенный раствор, в котором развивается большая часть всех микроорганизмов. Представители почвенной микрофлоры обитают в водных и коллоидных пленках, обволакивающих почвенные частицы.

Растительные и животные остатки, попавшие в почву, служат источником органических веществ, необходимых для питания почвенных микроорганизмов. В ризосфере (прикорневой зоне) и ризоплане (на поверхности корней), где также обитают микробы, между ними и растениями формируются особые взаимоотношения. Ряд веществ, продуцируемых растениями, а также живая масса корней представляют собой хороший питательный субстрат.

Из минеральных веществ в почве присутствуют нитраты и нитриты, карбонаты, бикарбонаты, сульфаты, хлориды, соединения железа, алюминия, марганца и др. Почвенные микроорганизмы осуществляют важнейшую функцию – *минерализацию сложных органических соединений, превращая их в формы, доступные для растений, и при этом очищая внешнюю среду от отходов, поступающих в результате жизнедеятельности животных и людей*. Одновременно с разложением органических остатков микроорганизмы-автотрофы синтезируют органические соединения собственных клеток и таким образом создают в почве запасы витаминов, аминокислот и др., которые попадают в оборотный капитал природы после их гибели. В почве формируются сообщества (ценозы) с разнообразным видовым и количественным составом микроорганизмов. В богатых органикой почвах количество бактерий может достигать нескольких миллиардов в 1г. Значительно меньше в почве актиномицетов, и в 1г не более 10 млн. Грибы представлены в различных почвах в количестве от нескольких сотен тысяч до нескольких миллионов в 1г. Содержание простейших в том же объеме обычно не превышает нескольких тысяч. Наличие большого количества микроорганизмов в почве служит косвенным показателем высокого ее плодородия. Наиболее заселенными являются черноземные, каштановые и сероземные почвы. *Состав микрофлоры определяется климатическими, почвенно-географическими условиями и зависит от комплекса факторов – содержания источников питания, влажности, рН, аэрации,*

структуры почвы, способов обработки, взаимоотношений между микроорганизмами и др.

Основную массу почвенных микроорганизмов составляют сапрофитные и лишь незначительное количество приходится на долю патогенных видов.

Санитарное состояние почвы оценивают на основании нескольких показателей:

1 – содержания общего количества микроорганизмов (общее микробное число),

2 - наличия санитарно-показательных микроорганизмов.

Для решения ряда агротехнических вопросов проводят определение общего количества микроорганизмов, участвующих в различных процессах превращения азота и углеродсодержащих веществ (аммонифицирующих, азотфиксирующих, целлюлозоразрушающих и др.). Например, перед внесением пестицидов обязательно определяют видовой и количественный состав почвенной микрофлоры.

Для почвы санитарно-показательными организмами служат бактерии группы кишечной палочки (БГКП или колиформные), фекальные энтерококки, термофильные бактерии, *Clostridium perfringens*, *Proteus* spp.

Патогенные микроорганизмы выявляют в объектах внешней среды чаще всего для того, чтобы оценить эпидемиологическую ситуацию и принять необходимые меры для ликвидации источников инфекции. Следует отметить, что неспорообразующие микроорганизмы относительно быстро погибают во внешней среде, не находя там подходящих условий для жизнедеятельности. Однако даже кратковременное их пребывание может стать причиной ряда инфекций. Так, возбудители брюшного тифа, лептоспироза и др., попадающие в почву с выделениями человека и животных, сохраняются в течение нескольких недель и даже месяцев. Шигеллы – возбудители бактериальной дизентерии не теряют патогенности, выживая в почве до 3-4 мес. Наибольшей устойчивостью во внешней среде обладают микроорганизмы, образующие споры, которые сохраняют жизнеспособность на протяжении десятилетий и даже столетий. Поэтому в зонах активного земледелия почву исследуют на содержание в ней спор возбудителей столбняка, чтобы провести своевременно профилактику лиц, работающих в земледелии.

Санитарно-микробиологическое исследование почвы

При изучении микрофлоры почвы необходимо принять во внимание то, что конечные количественные показатели в большей степени зависят от метода исследования. Так, при изучении микрофлоры мето-

дом прямого подсчета по Виноградскому результаты превышают фактическое содержание микроорганизмов. Это связано с тем, что при микроскопии окрашенных препаратов, приготовленных из разведений исследуемых почвенных проб, невозможно разграничить живые и мертвые клетки микроорганизмов. Более реальную картину количества микроорганизмов демонстрирует метод количественного учета бактерий, выросших на мясопептонном агаре (МПА).

Отбор проб. Почвенные пробы в количестве от 100 до 200 г берут с одинаковой глубины (от 10 до 30 см) в 4-5 точках участка площадью 25 квадратных метров. Взятые пробы помещают в стеклянные банки или в синтетические пакеты с помощью ножа, лопаты или совка. Из глубоких слоев почву берут буром. Если бура нет, то делают вертикальный надрез почвы до необходимой глубины и ножом или лопаткой берут несколько образцов с отвесной стороны разреза из нужного горизонта. Все приспособления и тара для почвенных образцов должны быть стерильными. Отобранные образцы почвы доставляют в лабораторию и проводят исследования. Анализы делают в тот же день. Допускается хранение почвы не дольше 24 ч в холодильнике при температуре 1 - 5° С.

Определение общего количества микроорганизмов в почве

1. Метод учета на мясопептонном агаре

Образцы почвы, доставленные в лабораторию, освобождают от крупных примесей – стекол, камней, корней и др. Крупные комочки почвы измельчают, затем образцы пропускают через сито с диаметром отверстий не более 3 мм., смешивают и из этой смеси берут навеску 10 г.

Приготовленную навеску вносят в колбу с 90 мл стерильной дистиллированной воды и тщательно перемешивают взбалтыванием в течение 5-10 мин. Такая обработка необходима для того, чтобы извлечь микроорганизмы из комочков земли и с поверхности почвенных частиц. Полученную однородную взвесь отстаивают 2 мин и затем готовят из нее ряд 10-кратных разведений, последовательно перенося стерильной пипеткой по 1 мл в пробирки с 9 мл стерильной дистиллированной воды. Схема последовательных разведений почвы представлена на рис. 1. При приготовлении разведений взвесь переносят в каждую последующую пробирку новой стерильной пипеткой. Таким образом, готовят разведения до 1:1000000 и более в зависимости от того, из каких почв были взяты пробы для исследования, и их предполагаемой заселенности микроорганизмами. Для посева используют не менее двух различных разведений (обычно используют два последних, максимальных). Из каждого выбранного разведения по 1 мл вносят в 2

стерильные чашки Петри (для получения средних показателей) и заливают 15-20 мл расплавленного и охлажденного до 45°C МПА. Осторожно передвигая чашки по поверхности стола, перемешивают агар с внесенными в него разведениями почвы. После застывания питательной среды чашки инкубируют в термостате при температуре 30-35°C в течение 24 - 48 ч. Количество микроорганизмов, содержащихся в 1г исследуемой почвы, определяют следующим образом. Подсчитывают количество колоний, выросших на каждой из двух чашек, суммируют полученные результаты и делят на 2, вычисляя среднеарифметический показатель, и умножают его на степень разведения. Для подсчета берут чашки, на которых выросло от 50 до 150 колоний.

Пример. В чашках, засеянных почвенной суспензией, взятой из разведения 1: 10000, выросли в среднем 75 колоний. 75 умножаем на степень разведения - 10000 и получаем результат - 750000 бактерий. То есть такое количество микроорганизмов содержится в 1 г исследуемого образца почвы.

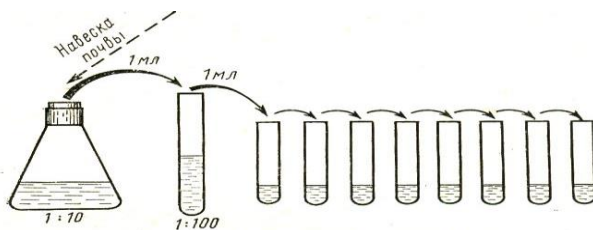


Рис. 1. Схема последовательных разведений почвы.

2. Метод прямого подсчета по Виноградскому

Исходное разведение почвы готовят так же, как и при использовании первого метода определения общего количества микроорганизмов. Для дальнейшей работы берут стерильной пипеткой суспензию из разведения 1:100 и наносят 0,01 мл на обезжиренное предметное стекло на площади в 4 см². Чтобы правильно распределить каплю по стеклу, под него подкладывают квадратик бумаги размером 2х2 см. Препарат высушивают, фиксируют на пламени горелки, окрашивают по Граму и микроскопируют, используя иммерсионный объектив. При просмотре препарата подсчитывают количество бактерий, находящихся в 100 полях зрения микроскопа или 100 квадратиков окулярной сетки. Вычисляют среднее количество бактерий в одном поле зрения и затем определяют содержание микроорганизмов в 1 г почвы.

Пример. Квадратик сетки имеет площадь 0,004 мм (край сетки =

0,02 мм), значит на 1 см он будет повторяться 25000 раз, а на всей площади препарата 100000 раз. В препарате было обнаружено, в среднем, 2 бактерии в одном квадратице. Следовательно на препарате площадью 4 квадратных сантиметра будет 200000 бактерий (2х 100000).

Определение общего количества бактерий группы кишечной палочки - БГКП

1. Метод мембранных фильтров

Почвенную суспензию, приготовленную так же, как в предыдущем исследовании, (см. определение общего количества микроорганизмов в почве), разводят от 1:10 до 1:1000 при исследовании чистых почв и от 1:1000 до 1:1000000 – при изучении загрязненных почв. Затем 5 или 10 мл полученных разведений фильтруют через мембранные фильтры с диаметром пор не более 0,45 мкм в аппарате Зейтца. Фильтры помещают на среду Эндо, в состав которой входят мясопептонный агар, лактоза и индикатор и инкубируют в термостате при температуре 37°C в течение 24 ч. При наличии бактерий группы кишечной палочки на фильтрах появляются колонии бактерий темно-красного цвета с металлическим блеском. Из колоний готовят мазки, окрашивают их по Граму, и микроскопируют. БГКП имеют палочковидную форму и при окраске приобретают красный цвет (т.е. являются грамотрицательными). Затем с культурой грамотрицательных лактозоположительных бактерий ставят оксидазный тест, который позволяет дифференцировать представителей семейства *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonadaceae*. Для определения оксидазной активности часть исследуемой колонии переносят стерильной петлей на фильтровальную бумагу, пропитанную диметил-п-фенилендиамином и анафтолом. У микроорганизмов, продуцирующих оксидазу, цвет колонии становится сине-фиолетовым. Бактерии группы кишечной палочки, которые являются оксидазоотрицательными не изменяют своего цвета. Дополнительно проверяют способность исследуемой культуры ферментировать глюкозу и разлагать белки. Колонии, выросшие на фильтрах на среде Эндо, учитывают как БГКП, если они образованы грамотрицательными, оксидазонегативными палочками, ферментирующими глюкозу до кислоты и газа и не разлагающими белки.

Для определения общего количества БГКП в исследуемой почве, подсчитывают количество колоний, выросших на фильтре, через который был пропущен определенный объем разведения почвенной болтушки. Затем вычисляют, сколько бактерий группы кишечной па-

лочки содержится в одном миллилитре этого разведения. Общее количество БГКП подсчитывают, умножая показатель содержания этих микроорганизмов в 1 мл на соответствующее разведение.

Пример: Было профильтровано 10 мл из разведения 1:10000. На фильтре выросло 20 колоний. Составляем пропорцию: В 10 мл - 20 бактерий, а в одном – х. Получаем результат : $X = (20 \times 1) : 10 = 5$ бактерий. Поскольку проба для фильтрования была отобрана из разведения 1:10000, умножаем 5 на 10000. Окончательный итог – в 1 г. почвы содержатся 50000 БГКП.

Микрофлора воды и методы ее изучения

Вода также как и почва представляет собой естественную среду обитания микроорганизмов. Это обусловлено тем, что в ней находятся органические и минеральные вещества – остатки растений, останки позвоночных и беспозвоночных животных. Численность микроорганизмов зависит от ряда факторов: климато-географических, температурных, аэрации, освещенности, скорости течения, глубины, солености, показателей рН водоема и др. Содержание микробов в 1 мл воды открытых водоисточников варьирует от десятков и сотен до десятков миллионов. Наибольший процент водных микроорганизмов составляют сапрофитные представители родов *Micrococcus*, *Sarcina*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Proteus*, а также дрожжи и плесневые грибы. Среди них присутствуют пигментообразующие и флюоресцирующие бактерии. Вместе с тем, в воде нередко находятся и патогенные микроорганизмы, которые попадают туда с различными стоками. В таких стоках может содержаться почвенная микрофлора, испражнения людей, животных и птиц. Нередко патогенные микробы попадают в водоемы при купании, стирке белья, водопое скота. Во время дождей, особенно обильных, в водоемы могут стекать потоки с участков земли, занятых под посевы сельскохозяйственных культур.

Для патогенных микроорганизмов вода – неблагоприятный биотоп для роста и размножения. Однако некоторые из них в течение длительного времени сохраняют жизнеспособность, не теряя патогенности, и могут стать причиной инфекционных заболеваний. Было установлено, что холерный вибрион может даже размножаться в теплой прибрежной воде, богатой органическими веществами и имеющей щелочной рН. Известно, что водным путем передаются брюшной тиф, бактериальная и амебная дизентерия, холера, лептоспироз, полиомиелит, гепатиты А и Е и ряд других болезней. При санитарно-бактериологическом исследовании воды определяют:

- *общее микробное число (общее количество микроорганизмов в 1 мл);*
- *наличие патогенных микроорганизмов;*
- *количество БГКП как показатель степени фекального загрязнения.*

Дополнительно определяют титр *Clostridium perfringens*, индекс бактериофага и наличие цист лямблий.

Наличие патогенных микроорганизмов определяют по эпидемиологическим показателям.

Исследованию подлежат: питьевая вода (водопроводная, колодезная, из артезианских скважин), вода открытых водоемов (реки, озера), плавательных бассейнов, а также сточные воды. Допустимое содержание отдельных видов микроорганизмов в различных водоисточниках регламентируется ГОСТом (государственным стандартом).

Отбор проб воды. Для взятия проб воды используют как много-разовую, так и одноразовую стерильную посуду. Многоразовая изготавливается из материалов, выдерживающих обработку сухим жаром и автоклавированием. Емкости для взятия проб воды закрывают плотными пробками и защитным колпачком из фольги или плотной бумаги.

Из открытых водоемов пробы берут обычно с глубины 10-15 см от поверхности, а из мелководных водоисточников - на уровне 10-15 см от дна. Для взятия проб используют также специальный аппарат – батометр (рис 2,3). Он состоит из металлического каркаса, в который вставляется бутылка для воды, закрываемая плотной пробкой с приспособлением для ее открывания. Этот аппарат укреплен на тросе, позволяющем опускать его на нужную глубину. Батометры часто используются при взятии глубинных проб воды из больших водоемов.



Рис. 2. Батометр

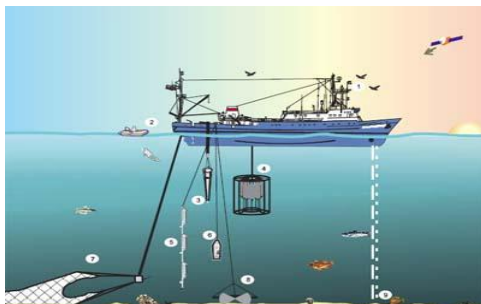


Рис.3. Взятие проб воды с помощью батометра

Перед взятием проб из водопровода кран протирают тампоном, смоченным спиртом, и обжигают, после чего 10-15 мин сливают застоявшуюся в трубах воду и только затем отбирают образец для исследования.

Анализ проводят сразу после взятия проб. При необходимости транспортировки воду сохраняют при температуре 1-5° С и анализируют не позднее чем через 2-6 ч с момента взятия пробы.

1. Определение общего количества микроорганизмов в воде

Общее микробное число воды определяют путем культивирования содержащихся в пробах бактерий в плотных питательных средах. В зависимости от предполагаемой загрязненности водоема перед посевом готовят десятикратные разведения исходной пробы в стерильной водопроводной воде. В таблице № 1 приведены рекомендуемые для посева разведения воды в зависимости от степени ее загрязненности (объем каждого разведения для дальнейшего посева в МПА составляет 1 мл).

Для получения разведений берут ряд пробирок, содержащих по 9 мл стерильной водопроводной воды. Исследуемую воду в объеме 1 мл вносят в первую пробирку, получают разведение 1:10, затем из этой пробирки переносят 1 мл в следующую и т.д. (рис.1). Для приготовления каждого разведения используют новую стерильную пипетку. Из полученных разведений вносят по 1 мл воды в 2 чашки Петри и заливают 15-20 мл расплавленного и охлажденного до 45°С МПА. Содержимое чашек тщательно перемешивают круговыми движениями, помещая их по поверхности стола. После застывания агара, чашки помещают в термостат на 24 ч при температуре 37°С. Колонии бактерий растут, как на поверхности питательной среды (аэробы), так и в ее глубине (анаэробы). Подсчитывают их суммарное количество и вычисляют общее микробное число. Если воду предварительно разводи-

ли, то полученную сумму умножают на степень разведения и в итоге получают количество микроорганизмов в 1 мл исходной воды.

Общее микробное число в 1 мл питьевой воды не должно превышать 50.

Таблица 1. Рекомендуемые для посева разведения воды в зависимости от степени ее загрязненности при определении общего микробного числа (объем каждого разведения для посева составляет 1 мл)

Тип исследуемой воды	Рекомендуемые для посева разведения воды
Водопроводная вода и вода артезианских колодцев	1мл исходной воды без разведения
Чистая вода (вода колодцев, родников и др., вода плавательных бассейнов)	1 и 1:10
Открытые водоемы, не загрязненные сточными водами	1; 1:10 и 1:100
Чистые водоемы в местах массового купания	1:10 и 1:100
Открытые водоемы, загрязненные сточными водами	1:10; 1:100 и 1:1000
Сильно загрязненные хозяйственно-бытовые воды и сточные жидкости	1:10000; 1:10 0000 и 1:100 000

2. Определение бактерий группы кишечной палочки (БКГБ)

Санитарно-показательными микроорганизмами в воде, также как и в почве, являются бактерии группы кишечной палочки (БГКП). Они также называются колиформными (от лат. *Escherichia coli* - кишечная палочка.) Эта группа объединяет факультативно анаэробных представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Все они имеют палочковидную форму, не образуют спор, грамотрицательные, оксидазоотрицательные, разлагают лактозу до кислоты и газа. Следует обратить внимание на температуру, при которой наиболее активно проявляются сахаролитические свойства колиформных бактерий. Большинство из них сбраживает лактозу через 24-48 ч при температуре 37°C. Такие бактерии относят к общим колиформным бактериям (ОКБ).

Отличительной особенностью термотолерантных колиформных бактерий (ТКБ) является то, что они разлагают лактозу до кислоты и газа при более высокой температуре - 44°C в течение более короткого времени – за 24 ч. Обнаружение термотолерантных колиформных бактерий (ТКБ) указывает на свежее фекальное загрязнение воды. Бактерии группы кишечной палочки выявляются различными методами. Наиболее распространенным является метод мембранных фильтров.

1. Определение БГКП методом мембранных фильтров

Для определения БГКП этим методом используют фильтровальный аппарат Зейтца, (рис. 4), который перед началом исследований протирают тампоном, смоченным в спирте, стерилизуют прокаливанием и устанавливают на колбе Бунзена.

Затем в прибор помещают нитрацеллюлозный или ацетатцеллюлозный мембранный фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм. Такие фильтры предварительно стерилизуют методом кипячения. Выбранный для исследования объем воды пропускают через фильтр, присоединяя аппарат к вакуумному насосу. Если анализируют несколько проб воды, то для каждой из них используют отдельный мембранный фильтр. Перед фильтрованием новой пробы аппарат стерилизуют. После пропускания через них воды фильтры помещают на поверхность среды Эндо в чашки Петри, располагая их на питательной среде фильтрующей стороной вверх. Чашки затем инкубируют в термостате 24 ч при 37°C. В состав среды Эндо входят лактоза, индикатор и МПА и поэтому БГКП образуют на ней колонии красного цвета с металлическим отливом. Подсчитывают количество таких колоний, готовят из них мазки и окрашивают по Граму, а также проверяют оксидазную активность. Оксидазоотрицательные бактерии, разлагающие лактозу до кислоты и газа, обнаруженные на фильтре, позволяют дать положительный ответ о наличии в воде БГКП. При анализе питьевой воды вычисляют количество БГКП, содержащихся в 100 мл.

Для дифференциации ОКБ (общих колиформных бактерий) и ТКБ (термотолерантных колиформных бактерий) каждую выросшую на фильтре колонию БГКП засевают в две пробирки с лактозной средой. Одну из пробирок предварительно прогревают до 44°C с тем, чтобы инактивировать ОКБ. Затем эту пробирку инкубируют при этой же температуре в течение 24 ч (для подтверждения наличия ТКБ). Вторую пробирку с посевом ставят в термостат при температуре 37°C на 48 ч, чтобы убедиться в наличии ОКБ.

Загрязненную воду открытых водоемов предварительно разводят, как указано в табл. № 1 и для фильтрации используют объем не менее 10 мл. Дальнейшие исследования проводят, как описано выше.

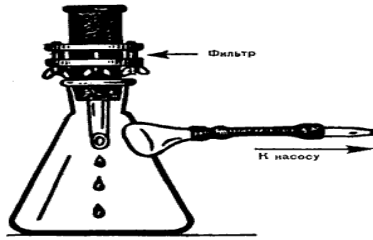


Рис. 4. Фильтр Зейтца и колба Бунзена для фильтрации воды

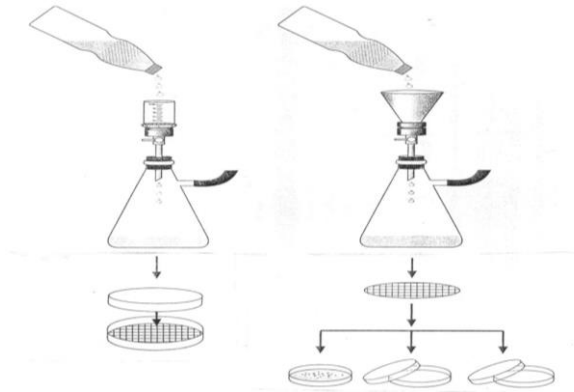


Рис. 5. Определение количества микроорганизмов методом мембранных фильтров

2. Определение БГКП бродильным (титрационным) методом

Этот метод известен также под названием «двухфазный бродильный метод». Для установления содержания колиформных бактерий в воде, исследуемые пробы засевают в глюкозо-пептонную среду (ГПС) для подрачивания микроорганизмов. Объемы воды при этом определяются в зависимости от водоисточника и предполагаемой степени его загрязненности.

1 этап исследования. (1 фаза) Исходный объем воды делят на несколько порций, которые засевают в различные объемы питательной среды. Например, посев воды с исходным объемом 300 мл производят следующим образом: два объема по 100 мл засевают в два флакона с 10 мл питательной среды, а 10 объемов по 10 мл той же пробы воды засевают в 10 пробирок, содержащих по 1 мл питательной среды. Посевы инкубируют в термостате при 43°C в течение 7 -12 ч.

Указанная температура подавляет рост сапрофитных микроорганизмов, но не влияет на колиформные бактерии.

На 2 этапе (2 фаза) из флаконов и пробирок, при наличии в них признаков роста (помутнение, газообразование) делают высевы петлей на чашки Петри со средой Эндо, разделенной на 3-4 сектора, и помещают их в термостат при 37°C на 18-20ч для того, чтобы получить рост изолированных колоний. Емкости с посевами воды в глюкозо-пептонной среде (ГПС), на которых через 7-12 ч не было признаков роста, оставляют в термостате еще на 24 - 48 ч. Отсутствие роста в них через 48 ч свидетельствует об отсутствии в воде БГКП. При просмотре посевов на среде Эндо обращают внимание на колонии красного, розового, бледно-розового цвета с металлическим блеском. Делают из них мазки, окрашивают по Граму и проверяют оксидазную активность, позволяющую дифференцировать ОКБ от других грамотрицательных бактерий. Наличие грамотрицательных, оксидазоотрицательных палочек свидетельствует о наличии в воде БГКП. Для определения термотолерантных колиформных бактерий по 2-3 лактозоположительные колонии из каждого сектора со среды Эндо засевают в пробирки с любой средой, содержащей лактозу, предварительно нагретой до 44°C и помещают в термостат на 24 ч при той же температуре. Образование в пробирках кислоты и газа свидетельствует о том, что в исследуемой пробе присутствуют термотолерантные колиформные бактерии (ТКБ). Это позволяет сделать вывод о свежем фекальном загрязнении воды.

Таблица 2. Нормативы безопасности питьевой воды в эпидемическом отношении по микробиологическим и паразитологическим показателям (по методическим указаниям «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды» МУК 4.2.1018-01)

Показатели	Единицы измерения	Нормативы
Общее микробное число ²	Число образующих колонии бактерий в 1 мл	Не более 50 колоний
Общее количество колиформных бактерий ²	Число бактерий в 100 мл	Отсутствие бактерий
Термотолерантные колиформные бактерии	Число бактерий в 100 мл ¹	Отсутствие бактерий
Колифаги ³	Число бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 100 мл	Отсутствие колифагов
Споры сульфитредуцирующих клостридий ⁴	Число спор в 20 мл	Отсутствие клостридий
Цисты лямблий ³	Число цист в 50 мл	Отсутствие цист

Примечание:

¹ Трехкратно исследуют по 100 мл отобранной пробы воды.

² Превышение норматива допускается в 5 % проб, отбираемых в точках водоразбора наружной и внутренней водопроводной сети в течение 12 мес., при количестве исследуемых проб не менее 100 за год.

³ Определяют только в системах водоснабжения из поверхностных источников перед подачей воды в распределительную сеть.

⁴ Определение проводят при оценке эффективности технологии обработки воды.

Санитарно-микробиологическое исследование воздуха

Воздух является неблагоприятной средой обитания для микроорганизмов, так как в нем отсутствуют питательные вещества, необходимые для поддержания их жизни и размножения. Одним из важных условий для выживания в воздухе является способность микроорганизмов противостоять высушиванию, действию ультрафиолетовых и радиоактивных лучей, колебаниям температуры и др. неблагоприятным факторам. Микрофлора атмосферного воздуха формируется в основном за счет почвенных микроорганизмов, в меньшей степени они попадают в воздух с поверхности воды или растений. Поэтому наибольшее количество микроорганизмов содержится вблизи земной поверхности.

В атмосферном воздухе обнаруживаются сапрофитные микроорганизмы, представленные кокками (микрочкокки, сарцины и др.) споровыми бактериями (*Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. mesentericus* и др.), актиномицетами и грибами (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* и др.). Они находятся в воздухе во взвешенном (аэрозольном) состоянии. Механизмами самоочищения воздуха являются действие солнечных лучей, оседание бактериальных аэрозолей под действием гравитации, постоянное перемешивание и повышенная влажность (дождь, снег). Максимальное количество микроорганизмов в воздухе обнаруживают летом (июнь-август), минимальное – зимой (декабрь-январь).

Атмосферный воздух значительно отличается по количеству микроорганизмов и их видовому составу от воздуха закрытых помещений. Бактериальная обсемененность воздуха закрытых помещений всегда выше, чем атмосферного воздуха. В составе воздуха закрытых помещений помимо сапрофитной микрофлоры находятся те микроорганизмы, которые выделяет человек через дыхательные пути (при разговоре, кашле, чихании), с поверхности кожи, с пылью загрязненного постельного белья и др. источников (домашние животные, декоративные птицы). Здоровый человек при чихании выделяет в воз-

дух 10 000-20 000 микробных тел, а больной или бактерионоситель – значительно больше. Микроорганизмы из ротоглотки человека находятся в воздухе в составе капелек слизи, которые могут часами удерживаться во взвешенном состоянии, образуя стойкие аэрозоли. Присутствие в воздухе патогенных микроорганизмов свидетельствует о санитарном неблагополучии объектов обследования, т.к. воздушно-капельным и воздушно-пылевым путем могут передаваться многие болезни (грипп, корь, дифтерия, коклюш, туберкулез и т.п.).

Для оценки санитарного состояния воздуха закрытых помещений определяют **общее микробное число и количество санитарно-показательных микроорганизмов, к которым относятся гемолитические стафилококки, α - и β -гемолитические стрептококки.** При необходимости, например в хирургических стационарах, родильных домах, дополнительно определяют наличие и количество синегнойной палочки и др. грамотрицательных условно-патогенных бактерий – возбудителей внутрибольничных инфекций.

Бактериальную обсемененность и количество санитарно-показательных микроорганизмов определяют по их количественному содержанию в 1 м³ (1000 литров) воздуха.

В настоящее время существует много методов и устройств для отбора проб воздуха и их исследования.

Наиболее простыми и доступными для проведения санитарно-бактериологического исследования воздуха являются седиментационный и аспирационный методы.

Седиментационный метод Коха (Koch, 1881 г) основан на спонтанном оседании микроорганизмов под действием силы тяжести на поверхности питательной среды открытой чашки Петри.

Для определения общего микробного числа две чашки Петри со стерильным МПА оставляют открытыми в течение 10-30 мин. Затем их закрывают, надписывают и инкубируют в термостате при 37°C в течение 24 час. Затем посевы выдерживают 24 час при комнатной температуре для выявления плесневых грибов. Таким образом, через 48 ч подсчитывают суммарное количество колоний, выросших на чашках. Исходят из того, что за 5 мин на поверхность 100 м² плотной среды оседают бактерии из 10 литров воздуха (Омелянский В.Л.).

Для выявления санитарно-показательных микроорганизмов используют специальные питательные среды: для стафилококков – желточно-солевой агар (экспозиция 15 мин), для гемолитических стафилококков и стрептококков – кровяной агар (экспозиция 10-15 мин), для грибов – среду Сабуро (посевы выдерживают 3-5- суток при 20-22 °С).

Аспирационный метод основан на ударном действии воздушной струи о поверхность питательной среды, на которую оседают микроорганизмы. Его проводят с использованием аппарата Кротова или его современных модификаций (ПУ-1Б и др.), которые состоят из узла для отбора проб воздуха, микроманометра и электромотора (рис. 5,6). В аппарате Кротова узел для отбора проб вмонтирован в металлический корпус и имеет центробежный вентилятор, площадку с зажимами для установки чашки Петри, крышку из плексиглаза, в которой вырезана клиновидная щель для всасывания воздуха. На площадку устанавливают открытую чашку Петри с питательной средой, закрывают крышкой аппарата и включают мотор. Вращением центробежного вентилятора воздух засасывается через клиновидную щель и с силой ударяется о поверхность питательной среды, на которой оседают микроорганизмы, равномерно распределяясь по ней. Скорость вращения чашки Петри регулируется, что позволяет пропускать разный объем воздуха в минуту, который фиксируется микроманометром. По истечении заданного времени экспозиции выключают мотор, чашку Петри с посевом воздуха снимают, закрывают и ставят в термостат.



Рис. 6. Аппарат Кротова для взятия проб воздуха



Рис.7. Устройство автоматического отбора проб воздуха – ПУ-1Б

Считают, что для определения общего микробного числа необходимо использовать МПА, скорость пропускания воздуха через аппарат 25 л/мин с экспозицией 4 мин, что гарантирует оседание микроорганизмов из объема не менее 100 л воздуха. Для обнаружения золотистого стафилококка используют желточно-солевой агар, гемолитических стафилококков и стрептококков - 3-5% кровяной агар, а время экспозиции увеличивают до 10-15 мин, что обеспечивает посев бактерий из 250-300 л воздуха.

Посев воздуха проводят в две чашки Петри с МПА или желточно-солевым агаром и выращивают 48 час (24 час в термостате при 37°C, затем выдерживают 24 час при комнатной температуре). Чашки Петри с кровяным агаром инкубируют в термостате при 37°C 24 час. Подсчитывают количество выросших колоний и полученные данные пересчитывают на 1 м³ исследуемого воздуха.

Например, на одной чашке Петри при подсчете обнаружено 246 колоний, на второй – 254, т.е. в среднем $246+254= 250$ колоний. Аппарат вращал чашку Петри 2 мин со скоростью 25 л/мин. Всего было пропущено 50 л воздуха. Таким образом в 50 л воздуха содержится 250 микробов, в общее микробное число в пересчете на 1 м³ воздуха составляет $(250 \cdot 1000) : 50 = 5000$ бактерий.

Изучение качественного состава микрофлоры проводят по обычным методикам: из колоний делают мазки, окрашивают по Граму, выделяют чистую культуру, которую идентифицируют.

При исследовании атмосферного воздуха дополнительно определяют спорообразующие анаэробы. С этой целью делают посев воздуха в объеме 200-300 л на чашки Петри с железо-сульфитной средой, инкубируют в термостате при 37°C 24 час.

Для выявления плесневых грибов посев воздуха делают на среду Сабуро и культивируют 3-5 суток при 20-22 °С.

Вопросы для самопроверки

1. Какие микроорганизмы называются санитарно-показательными?
2. Дайте характеристику БГКП (бактерий группы кишечной палочки)
3. Наличие каких бактерий в воде свидетельствует о свежем фекальном загрязнении?
4. Какие показатели определяют при санитарно-микробиологическом исследовании воды?
5. Что такое «микробное число» и как его определяют?
6. Какой метод используют для выявления БГКП в воде?
7. Для каких целей используют методы Коха и Кротова?
8. Назовите санитарно-показательные микроорганизмы, по наличию которых в воздухе можно определить его загрязненность
9. В чем заключается аспирационный метод и с какой целью его используют?
10. На каких средах культивируют БГКП?
11. В каких помещениях проводятся обязательные исследования воздуха с целью выявления санитарно-показательных микроорганизмов?

ЗАНЯТИЕ 2

САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГРУБЫХ КОРМОВ, СИЛОСА, СЕНАЖА, ЗЕРНА

Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения занятия: ПК-1 Способностью использовать нормативную и техническую документацию, регламенты, ветеринарные нормы и правила в производственном процессе;

ПК-5 Способностью организовывать входной контроль качества сырья и вспомогательных материалов, производственный контроль полуфабрикатов, параметров технологических процессов и контроль качества готовой продукции.

Цель занятия: ознакомить студентов с основными методами и показателями санитарно-микробиологической оценки кормов.

Формирование:

Знание: показателей санитарно-микробиологического исследования грубых кормов, силоса, сенажа, зерна.

Умение: применять знания санитарно-микробиологических исследований состояния кормов.

Владеть: методами определения санитарно-микробиологического исследования кормов.

Оборудование: микроскоп, стерильные чашки Петри, чашки Петри со средой Чапека, чашки Петри со средой Сабуро, сусло-агар, навески кормов, посуда лабораторная (чашки Петри, пробирки, пинцет, скальпель, покровные стекла, пипетки).

Задание: 1. Провести микроскопию посевов проб кормов с целью дифференцирования и определению родов плесневых грибов.

2. Определить качество силоса и сенажа органолептическим и химическим методом.

3. Микроскопией мазков определить качество силоса.

Содержание и методика работы

Корма для исследования отбирают методом средней пробы из разных мест партии. Образец корма должен быть массой не менее 1 кг. Упаковывают пробы в мешочки (нельзя упаковывать в целлофановые пакеты, в них корма быстро портятся) или стеклянные банки. Среднюю пробу сена, зерна, комбикорма отбирают в соответствии с существующими ГОСТами. При явном поражении грубых, сочных или других кормов плесенью исследуют пораженные и нормальные образцы.

В сопроводительной записке указывают дату взятия образца, название корма, хозяйство, точный адрес, место, где взят образец.

Органолептический анализ

Включает в себя определение сыпучести, цвета и запаха кормов. Доброкачественные корма имеют естественный цвет и специфический запах. Корма, пораженные плесневыми грибами, приобретают различные оттенки — красный, голубовато-зеленый, оливковый, черный и др. и запах — затхлый, плесневый, гнилостный и т.п.

Микологическое исследование

При наличии плесневых налетов на кормах с них делают соскобы и приготавливают препараты для микроскопии с целью определения вида грибов. Для определения глубинного поражения зерна дезинфицируют 3%-м раствором формалина, после чего промывают стерильной водой с 5%-м раствором аммиака для нейтрализации формалина и раскладывают на поверхности сред Чапека, Сабуро и др. Кусочки грубых кормов раскладывают стерильным пинцетом на поверхности питательной среды (Чапека, Сабуро и др.), а мучнистые корма берут на кончик скальпеля и рассыпают по поверхности питательной среды. Посевы помещают в термостат при 25-30°C; просматривают на 3, 5 и 9-е сутки после посева, подсчитывают количество колоний, обращая внимание на форму и окраску колоний, субстрата.

Чистую культуру выделяют переносом некоторого количества спор загнутой иглой в новую питательную среду. Предварительно вид грибов можно определить, просматривая колонии в чашке Петри под малым увеличением микроскопа. Окончательно вид гриба определяют под малым и средним увеличением микроскопа на предметном стекле в капле 50%-го глицерина под покровным стеклом. Обращают внимание на строение мицелия, органов спороношения.

Наиболее часто корма поражают патогенные и токсигенные штаммы грибов, относящихся к родам *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Stachybotrys*.

Представители рода *Mucor* на питательных средах образуют серовато-белые или с желтоватым оттенком пушистые колонии. *Rhizopus* — черноточечные, шерстично-войлочные колонии. Характерным для представителей родов *Mucor* и *Rhizopus* является не-септированный мицелий и шаровидные спорангии. *Stachybotrys* — бурые, почти черные, бархатистые колонии. У грибов рода *Stachybotrys* спороносные гифы разветвленные, от них отходят длинные конидиеносцы; на вершине конидиеносцев 5..8 продолговатых или яйцевидных стеригм, сросшихся у основания. Конидии продолговато-овальные. *Penicillium* образуют зеленого цвета мучнистые колонии. Отличительным признаком всех видов рода *Penicillium* являются разветвленные конидиенос-

цы, несущие цепочки конидий в виде кисточки. Стеригмы — бутылковидной формы.

Fusarium образуют ватообразные колонии с белоснежным (розовым, желтым, красным) оттенком. Для всех видов *Fusarium* характерны веретеновидно- или серповидно изогнутые макроконидии с перегородками и продолговато-овальные, грушевидные, шаровидные микроконидии. Цвет колоний, образованных грибами рода *Aspergillus*, зависит от вида гриба — белый, желто-зеленый, коричневатозеленый, серо-голубой, темно-зеленый, черный, темно-коричневый. Грибы рода *Aspergillus* имеют булабовидное расширение на конце конидиеносца, на котором располагаются в один или два яруса стеригмы. Конидии — круглые или эллипсоидные.

Токсико-биологический анализ

Наиболее часто используют кожную пробу на кроликах. С этой целью пробы массой 100 г измельченного корма переносят в плоскодонную колбу с притертой крышкой и заливают эфиром так, чтобы он покрывал корм на 2-3 см. Навеску периодически встряхивают в течение 24 ч. Затем экстракт фильтруют в фарфоровую чашку через бумажный фильтр и выпаривают в вытяжном шкафу.

На бедре или лопатке кролика выстригают шерсть (диаметр 4-5 см) и дважды с интервалом в 24 ч втирают эфирный экстракт в кожу. Реакцию учитывают ежедневно в течение семи дней. Реакция позволяет определить четыре степени токсичности кормов:

I (очень слабotoксические) — покраснение, повышение чувствительности кожи, шелушение;

II (слабotoксические) — покраснение, болезненность, незначительное утолщение кожи, мелкие одиночные желточные пузырьки;

III (токсические) — покраснение, сильное утолщение, болезненность, складчатость кожи, на всей поверхности очага желтоватые пузырьки, некроз, сплошной тонкий струп;

IV (резкотоксические) — покраснение, сильный отек, глубокий сухой некроз, долго незаживающая язва.

При проверке токсичности корма в биопробе на белых мышах экстракт из него вводят в желудок через зонд.

Кроме того, для токсико-биологического анализа кормов можно использовать пробу на простейших (парамеции), на рыбках гуппи, хроматографический метод и метод ИФА.

Определение микрофлоры силоса

Пробы силоса отбирают трижды: во время закладки для определения эпифитной микрофлоры; через 10-15 сут после закладки для

определения микрофлоры созревшего силоса; при вскрытии силоса. Пробы берут в 2-3 местах на глубине 1 м и помещают в стеклянные банки вместимостью 1-2 л.

При микробиологическом исследовании силоса готовят мазок на предметном стекле. Для этого растирают кусочки силоса в фарфоровой ступке с небольшим количеством воды до образования суспензии. Мазок окрашивают метиленовой синью и микроскопируют под иммерсионной системой микроскопа. В хорошем силосе встречаются единичные палочки и кокки, а в плохом — обнаруживают большое количество кокковых и палочек.

Для определения видового состава микрофлоры силоса проводят посеvy материала на сусло-агар, сусло-агар с мелом и т.п. Для этого готовят 5-7 десятикратных разведений материала. В чашки Петри, начиная с последнего разведения, вносят по 1 мл. После охлаждения питательных сред до 45-50°C их вносят в соответствующие чашки. Вращательными движениями смешивают разведения силоса со средой и оставляют до застывания. Затем помещают в термостат при 22-25 °C на 3-10 сут.

Численность разных физиологических групп микроорганизмов на плотных питательных средах определяют путем подсчета колоний из разных разведений. Подсчет ведут из трех разведений, в каждом из которых выросло не менее десяти колоний.

Полученные колонии грибов изучают методами висячей и раздавленной капли под малым и средним увеличением микроскопа с целью определения родовой и видовой принадлежности грибов.

Исследование силоса на присутствие в нем токсина ботулинуса

В силос могут попасть бациллы ботулинуса (*C. botulinum*), что нередко приводит к накоплению в силосуемой массе токсинов.

Для определения наличия токсина ботулинуса из подозрительных участков берут 1-2 кг силоса. Пробы заливают двойным количеством воды и оставляют для экстрагирования. Затем часть воды и силоса переносят в стерильную ступку и растирают. После 1-2-часовой выдержки материал фильтруют до получения прозрачной жидкости. Фильтрат делят на две части; одну прогревают до 80-100°C в течение 15-20 мин для разрушения токсина. Биопробу ставят на четырех морских свинках, которым выпаивают материал из шприца с канюлей: двум (контрольным) дают по 2 мл прогретого фильтрата, а двум другим — то же количество фильтрата, не подвергнутого термической обработке. По клинической картине болезни животных, получивших фильтрат без термической обработки, судят о наличии в силосе токсина ботулинуса.

Эпифитная микрофлора зерна

На поверхности зерна обитает разнообразная микрофлора. Часть микроорганизмов попадает туда из ризосферы, часть заносится с пылью и насекомыми. Однако на зерне, как и на всей поверхности растений, развиваются лишь некоторые микроорганизмы, так называемые эпифиты. Эпифитные микроорганизмы, размножающиеся на поверхности стеблей, листьев и семян растений, получили название микроорганизмов филлосферы. Эпифиты питаются продуктами экзосмоса растений; устойчивы к высоким концентрациям фитонцидов, выдерживают периодические колебания влажности. Численность этих микроорганизмов невелика и видовой состав их довольно постоянен: более 90 % составляют гниlostные бактерии, в основном это неспороносные бактерии рода *Pseudomonas*. Особенно часто на зерне встречается *Pseudomonas herbicola*, образующая на плотных средах золотисто-желтые колонии. Встречаются также *Pseudomonas fluorescens*, микрококки, молочнокислые бактерии, дрожжи. Бациллы и микроскопические грибы составляют небольшой процент. В определенных условиях эпифитные микроорганизмы могут быть полезны для растений, так как препятствуют проникновению паразитов в ткани растения. На хранение зерна эпифитные микроорганизмы могут действовать отрицательно. На развитие микроорганизмов на зерне, а, следовательно, на сохранность последнего решающее влияние оказывают: влажность, температура, степень аэрации, целостность зерна и состояние его покровных тканей. В зрелом зерне вода находится в связанном состоянии и недоступна микроорганизмам, которые в этом случае находятся в состоянии анабиоза. На зерне с повышенной влажностью микроорганизмы размножаются тем быстрее, чем выше температура. Развитие микробиологических процессов в хранящемся зерне с повышенной влажностью приводит к заметному, а иногда и очень значительному повышению температуры. Это явление получило название термогенез.

Самосогревание зерна ведет к смене микрофлоры. Свойственная зерну эпифитная микрофлора исчезает. Начинают обильно размножаться непигментированные неспороносные палочки, вытесняющие *Pseudomonas herbicola*. Позднее появляются термостойкие микрококки, образующие на плотных средах чаще всего мелкие белые плоские колонии, а также плесневые грибы, актиномицеты. Самосогревание свыше 40-50 С способствует развитию спорообразующих и термофильных бактерий.

По мере самосогревания изменяется видовой состав и плесневых грибов. Виды *Penicillium*, которые преобладали вначале, заменяются представителями рода *Aspergillus*.

Таким образом, по видовому составу микрофлоры можно судить не только о том, подвергалось ли зерно самосогреванию, но и насколько далеко зашел этот процесс. Преобладание *Pseudomonas herbicola* в микробном ценозе зерна служит показателем его хороших качеств. Большое количество спорообразующих бактерий и грибов указывает на потерю семенами всхожести.

Благоприятные условия для развития на зерне микроорганизмов приводят к накоплению выделяемых ими токсинов. При скармливании такого зерна скоту и домашней птице возникают отравления.

Правильное хранение зерна сводится к тому, чтобы не допускать развития на нем микроорганизмов.

Количественный учет микроорганизмов на зерне

Навеску массой 5 г помещают в колбу с 50 мл стерильной водопроводной воды и 2-3 г песка. Колбу взбалтывают круговыми вращательными движениями 10 мин. Из полученной вытяжки готовят разведения 1:100, 1:1000, 1:10000. (отдельными стерильными пипетками берут по 10 мл суспензии и переносят в колбы, содержащие по 90 мл стерильной водопроводной воды). Затем из каждого разведения делают глубинный посев на МПА в двух повторностях. Чашки инкубируют при 30С. наряду с МПА используют различные элективные среды. Через 3-5 дней инкубации подсчитывают общее число колоний, выросших на МПА в чашках, и рассчитывают количество микроорганизмов на 1г зерна.

Определение качественного состава микрофлоры зерна

Колонии группируют по культуральным признакам. Из каждой группы колоний готовят препараты, выявляют принадлежность микроорганизмов к роду или семейству и определяют численность микробов каждой группы в процентах от общего количества микроорганизмов.

На основании микробиологического анализа делают заключение о качестве зерна. На свежем доброкачественном зерне преобладает *Pseudomonas herbicola* (до 80 %), образующая блестящие оранжевые колонии. Встречаются *Pseudomonas fluorescens*, формирующие желтовато-зеленоватые флуоресцирующие колонии; непигментированные неспорообразующие палочки; дрожжи – блестящие, выпуклые, часто окрашенные в розовые тона колонии. При учете на сусло-агаре с мелом выявляются молочнокислые бактерии, образующие чечевицеобразные мелкие колонии с зонами растворения мела.

На несвежем зерне, хранившемся при повышенной влажности *Pseudomonas herbicola*, *Pseudomonas fluorescens* не выявляются. Обнаруживаются микрококки, образующие мелкие белые блестящие плос-

кие колонии; спорообразующие палочки; актиномицеты, а также не-спороносные палочки. При учете на сусло-агаре выявляются в большом количестве грибы.

Вопросы для самопроверки:

1. Микологическое исследование кормов, определение родов грибов.
2. Методы определения токсичности кормов.
3. По каким критериям устанавливают качество силоса, сенажа.
4. Какие микроорганизмы оказывают наибольшее влияние на качество силоса и сенажа.
5. Как проводится количественный учет микроорганизмов на зерне?

ЗАНЯТИЕ 3

САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НАВОЗА, ШКУР, ШЕРСТИ

Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения занятия: ПК-1 Способностью использовать нормативную и техническую документацию, регламенты, ветеринарные нормы и правила в производственном процессе;

ПК-5 Способностью организовывать входной контроль качества сырья и вспомогательных материалов, производственный контроль полуфабрикатов, параметров технологических процессов и контроль качества готовой продукции.

Цель занятия: ознакомить студентов с основными методами и методиками исследований навоза, шкур, шерсти.

Формирование:

Формирование:

Знание: показателей санитарно-микробиологического исследования навоза, шкур, шерсти.

Умение: применять знания санитарно-микробиологических исследований состояния навоза, шкур, шерсти.

Владеть: методами определения санитарно-микробиологического исследования навоза, шкур, шерсти.

Оборудование: пробы шкур, шерсти, питательные среды МПА, МПБ, Эндо в пробирках, плакаты, термостаты, микроскопы, спиртовки, плитки, пробирки с тампонами для приготовления смывов, пробирки со средой Кесслера, средой Кода, стерильные чашки Петри, стерильные пипетки на 1 см³, стерильные колбы на 500 см³, питательные среды: мясопептонный агар, сусло-агар или среда Сабуро, бактериологические петли, предметные стекла, набор красок по Граму, фильтровальная бумага.

Задание: 1. Изучить правила взятия исследуемого материала шкур, шерсти.

2. Ознакомится с порядком исследований в зависимости от качества шкур, шерсти.

Содержание и методика работы

Санитарно-микробиологическое исследование навоза

Навоз — экскременты животных, перемешанные с соломой, торфом и опилками. Состав и удобрительные свойства навоза зависят от вида животных, корма, подстилки, системы уборки и хранения.

В навозе содержится много органических соединений, поэтому он является благоприятной средой для развития различных микроор-

ганизмов. Содержание бактерий может достигать до огромных величин, особенно при благоприятных условиях (аэрация, температура). В навозе всегда находятся микроорганизмы, принимающие участие в почвообразовательных процессах: аммонифицирующие, нитрифицирующие, денитрифицирующие, клетчаткоразлагающие или целлюлозоразлагающие, азотфиксирующие, актиномицеты, плесневые грибы. Кроме перечисленных микроорганизмов, всегда есть представители нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта животных: кишечная палочка, энтерококки, большая группа молочнокислых бактерий, клостридий. Следовательно, с навозом в почву попадает огромное количество полезных микроорганизмов, что значительно усиливает микробиологические процессы в почве. Навоз приобретает свойства органического удобрения благодаря жизнедеятельности микробов.

Состав навоза непостоянен, он зависит от соотношения в нем твердых и жидких выделений, количества и качества корма, вида животных и других факторов. Так, конский и овечий навоз по сравнению с навозом крупного рогатого скота и свиней бывает богаче азотом, фосфором и калием. При скармливании животным концентрированных кормов получается навоз более высокого (как удобрение) качества.

Различают жидкий, полужидкий и твердый навоз - чаще с подстилочным материалом. Жидкий навоз получается при гидравлическом методе уборки помещения (влажность до 93%). Полужидкий (пастообразный) с влажностью до 85% — при содержании крупного рогатого скота и свиней без подстилки. Для получения твердого навоза животных содержат на подстилке из соломы или сфагнового торфа, влажность такого навоза 70-80%.

Предупредить потери ценных веществ в навозе и частично обезвредить его можно путем правильного хранения. Существует несколько способов хранения навоза: под скотом, плотный (анаэробный), рыхло-плотный (аэробно-анаэробный) и рыхлых (аэробный).

Хранение навоза под скотом. При таком методе хранения навоза он уплотняется, создаются анаэробные условия, вследствие чего исключаются бурные процессы жизнедеятельности бактерий — виновников потерь азота, благодаря чему в навозе сохраняется большое количество ценных веществ. Однако в воздухе помещений накапливаются аммиак и другие газы, которые раздражают слизистые оболочки животных. Неубранным навоз может быть источником бактериальных и вирусных возбудителей, т. е. создает антисанитарные условия в помещениях, поэтому их лучше очищать от навоза.

Плотное (анаэробное) хранение навоза. Навоз укладывают плотно в штабеля шириной 3-4 м, высотой до 2,0 м, произвольной

длины в специально отведенных местах (навозохранилищах). Сверху навоз герметизируют слоем торфа или земли толщиной 10-15 см. При этом создаются анаэробные условия, в которых медленно развиваются микробиологические процессы (табл. 11) и происходит незначительное повышение температуры (до 25-35°C). При такой укладке навоз перепревает только через 7-8 месяцев.

Таблица 11. Содержание микроорганизмов при созревании плотного навоза, млн в 1 г массы (по данным В.Н. Былинкиной)

Группа бактерий	Срок, прошедший с момента закладки навоза				
	Исходный материал	15 дней	1 месяц	2 месяца	4 месяца
Бактерии	940	2600	1800	140	130
Бациллы	6	15	20	7	6
Актиномицеты	1	1,6	1,8	0,9	1,5

При рыхло-плотном (аэробно-анаэробном) хранении навоз в штабеле вначале укладывают рыхлым слоем, чтобы создать аэробные условия, при которых идут энергичные микробиологические процессы, температура повышается до 50-60°C, и разогревшийся навоз уплотняется. Через несколько дней следующий слой навоза снова укладывается рыхло, и так до образования штабеля высотой 2 м. При этом азота теряется больше, чем при холодном способе.

При рыхлом (аэробном) хранении навоза создаются аэробные условия, что способствует бурному развитию микробиологических процессов. Аммонификаторы разлагают белковые вещества до аммиака, используемого аэробными нитрифицирующими бактериями, которые окисляют его до нитритов и нитратов, то есть создают пищу для денитрификаторов. При создании анаэробных условий в глубоких слоях навоза денитрификаторы восстанавливают соли азотистой и азотной кислот до молекулярного азота, который улетучивается. Благодаря деятельности последних за 3-4 мес хранения в таком навозе сохраняется 30-40% органических веществ.

Микробиологические процессы интенсивно протекают на поверхности при достаточной аэрации. В глубоких слоях перепревание навоза идет медленно. В разогретой массе температура достигает 70-80°C, что приводит к гибели и сапрофитных, и патогенных форм бактерий. При интенсивно протекающих микробиологических процессах происходят потери ценных веществ и среди них важных для растений азота и фосфора.

В зависимости от эпизоотической обстановки в хозяйстве, можно направленно вести микробиологические процессы в навозе и тем самым улучшить эпизоотическую обстановку.

Биотермическое обеззараживание навоза. Навоз, полученный от больных животных, может содержать возбудителей многих опасных болезней сельскохозяйственных животных и быть фактором передачи возбудителей инфекции и инвазии. В естественных условиях возбудители инфекционных и инвазионных заболеваний животных длительно выживают в навозе, так как он служит защитой для микробов, вирусов и яиц гельминтов от различных вредных внешних воздействий.

При заболеваниях, вызванных бактериями, не образующими споры, вирусами, а также при инвазионных болезнях навоз подвергают биотермическому обеззараживанию в навозохранилищах. Для обеззараживания навоза отводят и подготавливают специальный участок глубиной 25 см, шириной до 2,5 м и произвольной длины. Перед укладкой навоза в штабель на дно расстилают слой соломы или торфа толщиной 30-40 см, а затем на него укладывают навоз высотой до 2 м от больных животных без подстилочного материала или твердую фракцию разжиженного навоза. Уложенный в штабель навоз обкладывают со всех сторон незараженным навозом, торфом или соломой слоем 10 см, а сверху наносят такой же слой земли. В зависимости от устойчивости возбудителя обезвреживание навоза биотермическим способом проводят в течение 2-6 мес. При температуре, создаваемой микробами (70-80°C), погибают возбудители сальмонеллеза, колибактериоза, рожи свиней, бруцеллеза, ящура и другие возбудители.

Навоз, полученный от животных, больных и подозреваемых по заболеванию сибирской язвой, эмкармом, бешенством, паратуберкулезным энтеритом и чумой крупного рогатого скота сжигают.

Исследование навоза производят так же, как и почвы.

Микрофлора шерсти, кожевенно-мехового сырья

Шкура состоит из трех слоев: эпидермиса, дермы и подкожной клетчатки. Внутренний слой шкуры после съемки с животного называется мездриной стороной (мездрой). Парная, только что снятая с животного шкура содержит до 7% воды, белковые вещества, жиры и минеральные вещества. Таким образом, в состав парной шкуры входят все вещества, необходимые для питания микроорганизмов.

На шерстном покрове шкуры всегда находится множество различных микроорганизмов. Свежая мездра бывает стерильная, на ее поверхность микробы попадают во время съемки и обработки шкуры.

Источником микрофлоры парной шкуры являются навоз, почва, вода, воздух, она загрязняется с инструментом и рук, с поверхности применяемого оборудования. На парной шкуре сразу после убоя обнаруживаются кишечная палочка, стафилококки, гнилостные бактерии, протей и дрожжи и т.д.

Состав микроорганизмов находящихся на шкуре, очень разнообразен: обнаруживаются кишечная палочка, стафилококки, гнилостные бактерии, протей, плесневые грибы, дрожжи и актиномицеты, обладающие широким набором ферментативных свойств. Начало разложения тканей можно заметить по изменению цвета, консистенции и гнилостному запаху.

Гнилостное разложение протекает в три стадии. Первая характеризуется быстрым размножением бактерий в подкожной клетчатке с последующим проникновением их в слой эпидермиса и волосяные сумки. Видимых изменений нет. Во второй стадии микробы проникают вглубь шкуры, при этом мездра ослизняется и темнеет, волос легко выпадает. В третьей стадии ткань дермы разлагается, становится ослизлой и дряблой, эпидермис легко отслаивается. Шкура теряет прочность, легко разрывается и издает сильный гнилостный запах (сероводорода, аммиака).

В начале гнилостного процесса на поверхности шкуры преобладают аэробные аммонификаторы (*Proteus vulgaris*, *E. coll. Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Bac. megaterium* и др.), а по мере продвижения в толщу шкуры можно обнаружить анаэробы *Cl. putrificum*, *Cl. sporogenum*.

Плесневение шкур происходит при хранении их в сырых прохладных помещениях. На поверхности влажной мездры появляются пигментированные колонии плесневых грибов, которые быстро заражают все сырье. Протеолитические ферменты психрофильных бактерий и плесневых грибов разрушают мездру, в результате чего снижается товарная ценность сырья.

Из шкуры в двух-трех местах берут около 1 г содержимого, помещают в чашку Петри, увлажняют физраствором, затем помещают в стерильную ступку, заливают 5 мл стерильного физраствора, разминают пестиком и оставляют на 2 — 3 ч для размягчения. После этого тщательно растирают в ступке до получения волокон мезги. Мезгу отнимают и удаляют. Полученной взвесью заражают подкожно 2 белых мышей, а остаток прогревают 30 мин при 65 °С; затем 0,5 мл взвеси после охлаждения высевают дробно в 5 чашек Петри на МПА. Высевы из шкур и шерсти инкубируют при 37 °С, через 18 — 24 ч чашки просматривают, отбирают подозрительные колонии и определяют вид

микробов. При падеже мышей вскрывают, выделяют патогенные микроорганизмы и идентифицируют. Затем исследуют на сибирскую язву с помощью РА.

На поверхности шерсти микроорганизмы находятся всегда. Аммонификаторы (*Bac. Mesentericus* и др.), разрушая кератин, разрушают и шерстное волокно. В сырой слежавшейся шерсти интенсивно развиваются термофилы, вызывая согревание, потемнение, обугливание и даже самовоспламенение, так как микроорганизмы вырабатывают газообразные вещества, которые при взаимодействии с кислородом воздуха возгораются.

При исследовании шерсти наиболее загрязненные ее комки и пряди помещают в стерильную ступку, увлажняют небольшим количеством физраствора, измельчают ножницами, переносят в колбу с бусами емкостью 100 мл, наполнив ее до половины. Заливают физраствором, чтобы получить 12—15 мл смыва. Далее поступают аналогично исследованию кож.

Кожевенно-меховое сырье, полученное от больных животных, может служить источником возбудителей инфекционных болезней. При контакте человека с таким сырьем происходит его заражение. Особенно опасно сырье, обсемененное спорообразующими возбудителями, которые длительное время сохраняются во внешней среде. Шкуры от вынужденно убитых животных должны быть проверены на сибирскую язву при помощи реакции преципитации (Асколи). Сырье от больных животных тщательно дезинфицируют или уничтожают, если есть подозрение на наличие возбудителя сибирской язвы, эмфизематозного карбункула или других особо опасных возбудителей.

Для предотвращения распространения возбудителей через кожевенно-меховое сырье необходимо соблюдать ветеринарно-санитарные правила на складах и предприятиях по его обработке.

Вопросы для самопроверки:

1. Перечислите методы хранения навоза.
2. На чем основано биотермическое обезвреживание навоза?
3. При каких инфекционных болезнях сельскохозяйственных животных навоз подлежит сжиганию?
4. Каковы методы отбора проб кож, шерсти?
5. Какие методики используются для микробиологического исследования кож, шерсти?
6. Перечислите виды микроорганизмов, участвующих в микробном разложении кожевенного сырья.

ЗАНЯТИЕ 4

САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛОКА, МАСЛА

Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения занятия: ПК-1 Способностью использовать нормативную и техническую документацию, регламенты, ветеринарные нормы и правила в производственном процессе;

ПК-5 Способностью организовывать входной контроль качества сырья и вспомогательных материалов, производственный контроль полуфабрикатов, параметров технологических процессов и контроль качества готовой продукции.

Цель занятия: ознакомить студентов с основными методами и показателями санитарно-микробиологической оценки молока и масла.

Знание: показателей санитарно-микробиологического исследования сырого молока, пастеризованного, стерилизованного молока, масла.

Умение: применять знания санитарно-микробиологических исследований состояния молока и масла.

Владеть: методами определения общего количества микробов, количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, наличия патогенных микроорганизмов, количества БГКП как показатель степени фекального загрязнения.

Оборудование и материал: проба пастеризованного молока, пробирки с 9 см³ стерильной воды, стерильные пипетки на 1 см³ и чашки Петри, пробирки с питательными средами: с МПА или средой для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ); со средой Сабуро; средой Кесслера с поплавками для демонстрации приготовления разведений продукта и посева молока на питательные среды; чашки Петри и пробирки с посевами разведений молока после культивирования для оценки результатов микробиологического анализа, пробы масла различной свежести, пробирки со стерильной водой, водяная баня, термостат, стерильные градуированные пипетки, пробирка, покровные и предметные стекла, растворы красок, стерильные пробирки с резиновыми или корковыми пробками, микроскопы, чашки Петри с МПА, бактериологические петли.

Задание: 1. Определить бактериальную обсемененность сырого молока по редуктазной пробе.

2. Определить КМАФАнМ и БГКП в сыром молоке.

3. Провести групповой анализ микрофлоры сырого молока путем посева его разведений на различные питательные среды для учета

количества молочнокислых, протеолитических, липолитических, маслянокислых бактерий, дрожжей и плесеней.

3. Определить бродильный титр пастеризованного молока.

4. Определить КМАФАнМ пастеризованного молока.

5. Расплавить сливочное масло на водяной бане и приготовить разведения от 10–1 до 10–5.

6. Для определения КМАФАнМ засеять в чашки Петри по 1 см³ 10–2, 10–3 и 10–4 разведений масла и залить чашки расплавленным и остуженным до температуры 45⁰ С МПА.

7. Для определения количества дрожжей и плесеней засеять в чашки Петри первое и второе разведения масла и залить чашки сушлом-агаром.

8. Для определения количества протеолитических бактерий засеять в чашки первое и второе разведения масла и залить чашки молочным агаром.

9. Для определения БГКП засеять 1 см³ продукта и его первое и второе разведения в пробирки со средой Кесслера.

10. Руководствуясь данными, определить соответствие исследуемого масла нормативным показателям.

Содержание и методика работы

Санитарно-микробиологическое исследование молока

Пробы для микробиологического исследования отбирают в стерильную посуду с помощью стерильных приспособлений. Объединенную пробу объемом 500 см³ составляют из точечных проб, отобранных из каждой фляги или цистерны после органолептической оценки молока и рассортировки его по кислотности.

Проба на редуктазу

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

Редуктазная проба с метиленовым синим

В стерильную большую пробирку наливают 1 см³ рабочего раствора метиленового синего и 20 см³ исследуемого молока. Пробирку закрывают резиновой пробкой и ее содержимое смешивают путем медленного трехкратного переворачивания пробирки. Пробирку помещают в редуктазник или водяную баню с температурой воды 37⁰С.

Вода в редуктазнике или водяной бане после погружения пробирки с молоком должна доходить до уровня жидкости в пробирке или быть немного выше. Момент погружения пробирок в редуктазник считают началом анализа. Наблюдение за изменением окраски ведут через 40 мин; 2,5 и 3,5 ч с начала проведения анализа. Окончанием анализа считают момент обесцвечивания окраски молока, при этом остающийся небольшой кольцеобразный окрашенный слой сверху (шириной не более 1 см) или небольшая окрашенная часть внизу пробирки (высотой не более 1 см) в расчет не принимаются. Появление окрашивания молока в этих пробирках при встряхивании не учитывают (табл. 3).

Редуктазная проба с резазурином

Пробу с резазурином следует проводить не ранее чем через 2 ч после доения. В пробирку наливают 1 см³ рабочего раствора резазурина и 10 см³ исследуемого молока, закрывают резиновой пробкой и смешивают путем медленного трехкратного переворачивания пробирки. Дальнейшая последовательность анализа такая же, как и в пробе с метиленовым синим. Пробирка с молоком и резазурином на протяжении анализа должна быть защищена от прямых солнечных лучей (редуктазник следует плотно закрыть крышкой).

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

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

Таблица 3. Оценка степени обсемененности молока микроорганизмами по продолжительности изменения окраски молока с метиленовым синим или резазурином

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

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

Метод основан на способности мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов размножаться на плотном питательном агаре при температуре 30⁰ С в течение 72 ч. Количество засеваемого продукта устанавливают с учетом наиболее вероятного микробного обсеменения.

При исследовании сырого молока в питательную среду засевают его разведения от 10–4 до 10–6 см³. По 1 см³ каждого разведения засевают в две чашки Петри с заранее маркированной крышкой и заливают 10–15 см³ расплавленного и остуженного до 40–45 С мясоептонного агара (МПА). Сразу после заливки агара содержимое чашки Петри тщательно перемешивают путем легкого покачивания для равномерного распределения посевного материала. После застывания агара чашки Петри переворачивают крышками вниз и ставят в таком виде в термостат с температурой (30 ± 1) С на 72 ч. Количество выросших колоний подсчитывают на каждой чашке, поместив ее вверх дном на темном фоне, пользуясь лупой с увеличением в 4–10 раз. При большом числе колоний и равномерном их распределении в питательном агаре дно чашки Петри делят на четыре и более одинаковых секторов, подсчитывают число колоний в двух–трех секторах, но не менее чем на 1/3 поверхности чашки, находят среднее арифметическое число колоний и умножают на общее количество секторов всей чашки. Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в 1 см³ молока X вычисляют по формуле

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

где n – количество колоний, подсчитанных на чашке Петри;
 m – число десятикратных разведений. За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое, полученное по всем чашкам.

Определение бактерий группы кишечных палочек

В настоящее время к БГКП относят следующие роды из семейства *Enterobacteriaceae*: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*. Бактерии группы кишечных палочек представляют собой мелкие граммотрицательные палочки, в основном подвижные (кроме бактерий рода *Klebsiella*), не образующие эндоспор и капсул. Они не обладают оксидазной активностью, ферментируют лактозу и глюкозу с образованием кислоты и газа при температуре 37 °С. Исследование на присутствие БГКП в молочных продуктах проводят в несколько этапов.

Определение бродильного титра

Метод основан на способности БГКП сбрасывать в питательной среде лактозу с образованием кислоты и газа при температуре (37 ± 1) С в течение 24 ч. В молочной промышленности для определения бродильного титра используют среду Кесслера, в которую в качестве углевода вносят лактозу; в качестве вещества, ингибирующего рост других групп бактерий, – бычьей желчь, а в качестве индикатора – генианвиолет. Бродильный титр в сыром молоке определяют следующим образом. В пять пробирок со средой Кесслера вносят по 1 см³ соответствующего разведения молока (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) и ставят их в термостат при температуре (37 ± 1) °С на 18–24 ч. По окончании инкубации пробирки просматривают. При отсутствии газообразования в поплавке в пробирке с наименьшим из засеваемых объемов дают заключение об отсутствии в продукте БГКП. При наличии газообразования в поплавке в пробирке с наименьшим из засеваемых объемов считается, что БГКП обнаружены в этом количестве.

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

Окрашивание препаратов из характерных колоний по Граму

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

Таблица 4. Микробиологические показатели сырого молока

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются		Примечание
		БГКП (колиформы)	патогенные, в том числе сальмонеллы	
<i>Молоко сырое</i>				
Высший сорт	1·10 ⁵	–	25	Соматические клетки, не более 4·10 ⁵ в 1 см ³
Первый сорт	5·10 ⁵	–	25	Соматические клетки, не более 1·10 ⁶ в 1 см ³
Второй сорт	4·10 ⁶	–	25	Соматические клетки, не более 1·10 ⁶ в 1 см ³
<i>Молоко, сыворотка, пахта пастеризованные</i>				
В потребительской таре	1·10 ⁵	0,01	25	<i>S.aureus</i> в 1 см ³ не допускаются, <i>L.monocytogenes</i> в 25 см ³ не допускаются
Во флягах и цистернах	2·10 ⁵	0,01	25	<i>S.aureus</i> в 0,1 см ³ не допускаются, <i>L.monocytogenes</i> в 25 см ³ не допускаются
<i>Сливки пастеризованные</i>				
В потребительской таре	1·10 ⁵	0,01	25	<i>S. aureus</i> в 1 см ³ не допускаются, <i>L. monocytogenes</i> в 25 см ³ не допускаются
Во флягах и цистернах	2·10 ⁵	0,01	25	<i>S. aureus</i> в 0,1 см ³ не допускаются, <i>L. monocytogenes</i> в 25 см ³ не допускаются
Молоко топленое	2,5·10 ³	1,0	25	<i>S. aureus</i> не допускаются, <i>L.monocytogenes</i> в 25 см ³ не допускаются
Молоко и сливки стерилизованные	Требования промышленной стерильности: 1) после термостатной выдержки при температуре 37 ⁰ С в течение трех–пяти суток – отсутствие видимых дефектов и признаков порчи (вздутие упаковки, изменение внешнего вида и другие), отсутствие изменений вкуса и консистенции; 2) после термостатной выдержки допускаются изменения: а) титруемой кислотности – не более чем на 2 ⁰ Т; б) КМАФАнМ – не более 10 КОЕ/см ³ (г)			

Групповой количественный учет микроорганизмов в сыром молоке

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

Количественный учет молочнокислых бактерий

Молочнокислые бактерии, размножаясь в сыром молоке, накапливают молочную кислоту, что приводит к повышению титруемой кислотности молока и ухудшению его технологических свойств. Для определения количества молочнокислых бактерий делают посев разведений сырого молока в чашки Петри, в которые перед стерилизацией вносят по 0,5 г тонко измельченного мела. После этого чашки заливают расплавленным и остуженным до температуры 45–50⁰С агаром с гидролизованным молоком. После застывания агара чашки переворачивают вверх дном и ставят в термостат с температурой (35± 1)⁰С на 36–48 ч. После инкубации подсчитывают количество колоний молочнокислых бактерий по зонам просветления вокруг них, которые появляются за счет образования растворимого лактата кальция.

Количественный учет протеолитических бактерий

Протеолитические бактерии разлагают белки молока с образованием пептонов и пептидов, поэтому присутствие их в молоке и молочных продуктах крайне нежелательно. Они вызывают появление в молочных продуктах горького вкуса. Метод определения протеолитических бактерий основан на их способности расщеплять белки под действием протеолитических ферментов. Для определения количества протеолитических бактерий производят посев по 1 см³ каждого из выбранных разведений молока в стерильные чашки Петри, которые затем заливают расплавленным и остуженным до температуры 45–50⁰С молочным агаром.

После застывания агара чашки с посевами выдерживают в термостате при температуре (30±1)⁰С в течение 36–48 ч, а затем подсчитывают количество колоний протеолитических бактерий по зонам просветления вокруг них, образующихся вследствие разложения молочного белка. К наиболее распространенным протеолитическим бактериям относятся псевдомонады, палочки протей, большинство спорообразующих бактерий.

Количественный учет маслянокислых бактерий

Маслянокислые бактерии при развитии в молочных продуктах вызывают такие пороки, как вспучивание, неприятный вкус и запах (вследствие накопления масляной, уксусной кислот и СО₂). Учет маслянокислых бактерий производят методом предельных разведений, высевая разведения исследуемого продукта в пробирки со стерильным молоком и парафином. После посева пробирки нагревают в водяной бане при температуре 85⁰ С в течение 10 мин, охлаждают до 30⁰С и выдерживают в термостате при температуре 30⁰С в течение трех су-

ток. Наличие маслянокислых бактерий определяют по трем признакам: – образованию газа; – запаху масляной кислоты; – наличию в микроскопическом препарате спорообразующих бактерий, имеющих форму барабанных палочек и дающих положительную реакцию на гранулезу (запасное крахмалоподобное вещество). Для обнаружения гранулезы каплю взвеси исследуемых микробов наносят на предметное стекло, смешивают с каплей раствора Люголя и накрывают покровным стеклом. Гранулеза, содержащаяся в клетках, окрашивается йодом в синий цвет. Определение основных групп микроорганизмов, наиболее часто встречающихся в сыром молоке, приведено в табл. 5.

Таблица 5. Определение основных групп микроорганизмов в сыром молоке

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

Количественный учет липолитических бактерий

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

Для определения липолитических бактерий на дно чашки Петри заливают стерильный расплавленный говяжий жир и тут же его сливают. На дне остается тонкий слой застывшего жира. В эту же чашку Петри вносят 1 см³ исследуемого разведения молока и заливают рас-

плавленным и остуженным до температуры 45–50⁰ С питательным агаром. После застывания агара чашки с посевами выдерживают при комнатной температуре (20 ± 2)⁰ С в течение пяти–шести суток. Подсчитывают количество колоний липолитических микроорганизмов, вокруг которых образовались белые зоны.

Количественный учет дрожжей и плесеней

Учет дрожжей и плесеней в молоке производят посевом соответствующих разведений молока в чашки Петри, которые затем заливают расплавленным и остуженным до температуры 45–50⁰ С суслом-агаром или средой Сабуро. Чашки выдерживают в термостате при температуре (30 ± 2)⁰ С в течение трех суток. Подсчитывают отдельно количество колоний дрожжей и колоний плесеней.

Микробиологический контроль пастеризованного молока

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

Отбор проб. Пастеризованное молоко во флягах после тщательного перемешивания стерильной мутовкой отбирают черпаком в количестве 50–60 см³ в стерильную посуду с пробкой. Продукты, расфасованные в потребительскую тару, отбирают по одному – два образца от партии. Кончик пакета протирают ватой, смоченной спиртом, и отрезают ножницами, предварительно профламбированными в пламени спиртовки. При контроле молока из секции охлаждения пастеризатора обжигают пробный кран и наливают молоко в стерильную посуду с пробкой.

Контроль эффективности пастеризации

Эффективность пастеризации молока и сливок контролируют вне зависимости от качества готового продукта не реже одного раза в декаду. Для этого 10 см³ молока, отобранного после секции охлаждения, засевают в 50 см³ среды Кесслера.

Бактерии группы кишечной палочки не должны обнаруживаться в указанном объеме молока, проба на фосфатазу должна быть отрицательной. Общее количество бактерий в 1 см³ молока, отобранного после секции охлаждения пастеризатора, не должно превышать 10 тыс.

Определение КМАФАнМ и БГКП

В отобранных пробах молока определяют КМАФАнМ. Для посева готовят разведения продукта от 10–1 до 10–5 см³. Для определения БГКП делают посев одного, двух и трех разведений продукта в среду Кесслера.

Микробиологические показатели молока и сливок пастеризованных приведены в табл. 3

Микробиологический контроль стерилизованного молока

Для контроля стерилизованного в потоке молока отбирают для исследования по одному пакету через каждый час работы с каждого фасовочного автомата. Контроль готовой продукции осуществляют не реже двух раз в неделю. Отобранные образцы должны соответствовать требованиям *промышленной стерильности*. Для определения промышленной стерильности отобранные упаковки со стерилизованным молоком выдерживают при температуре 37⁰ С в течение трех суток, а со сливками – в течение пяти суток. После термостатной выдержки проводят осмотр образцов продукта. При наличии вздутия упаковки или изменения внешнего вида молока в бутылках (наличия сгустка, отстоя сыворотки, наличия хлопьев молока и др.) упаковки считают неотвечающими требованиям промышленной стерильности. Упаковки без внешних дефектов вскрывают, стерилизованное молоко и сливки анализируют органолептически.

Продукт отвечает требованиям промышленной стерильности, если не установлено изменений консистенции и вкуса, кислотность молока увеличилась не более чем на 2⁰T, в микроскопическом препарате отсутствуют клетки бактерий, а общее количество микроорганизмов в 1 см³ не превышает 10. (см. табл. 3.)

Санитарно-микробиологическое исследование сливочного масла

Отбор пробы масла. Образец масла в транспортной таре отбирают стерильным шупом, предварительно сняв верхний слой, на расстоянии 3–5 см от края, направляя шуп к противоположной стороне и опуская на 3/4 его длины. Из столбика масла на шупе отбирают стерильным шпателем 15–20 г масла и помещают в стерильную посуду. Оставшийся после отбора пробы столбик масла на шупе возвращают на прежнее место, а поверхность масла аккуратно заделывают. От партии масла в потребительской таре отбирают для анализа стерильным шпателем 15–20 г, включая поверхностный слой. Отобранную пробу помещают в стерильную посуду, которую закрывают стерильной пробкой.

Подготовка пробы к анализу. Перед исследованием пробу масла расплавляют на водяной бане при температуре 40–45⁰ С и перемешивают для получения однородной эмульсии. Из полученной эмульсии стерильной пипеткой берут 1 см³ и вносят в пробирку с 9 см³ стерильного физиологического раствора, подогретого до 40⁰ С. Из полученно-

го таким образом первого разведения готовят второе разведение. В кисломолочном масле два раза в месяц определяют наличие БГКП, патогенных бактерий, протеолитических бактерий, дрожжей и плесеней, а в сладкомолочном, кроме того, общее количество микроорганизмов (КМАФАнМ). При необходимости определяют количество липолитических бактерий. Бродильный титр определяют посевом 1 см³ продукта и его 10⁻¹ и 10⁻² разведений в пробирки со средой Кесслера. Количество протеолитических бактерий определяют посевом на молочный агар по 1 см³ разведений от 10⁻¹ до 10⁻⁴ для сладко-сливочного масла и от 10⁻¹ до 10⁻³ для кисломолочного масла. Чашки с посевами помещают в термостат при температуре (30±1)⁰ С и инкубируют в течение 24 ч. Протеолитические бактерии учитывают по зонам просветления вокруг колоний, которые образуются в результате разложения белка этими микроорганизмами. Количество дрожжей и плесеней определяют посевом в чашки Петри от 10⁻¹ до 10⁻² разведений масла, которые затем заливают суслон-агаром. Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в сладкомолочном масле определяют посевом в чашки Петри с МПА 10⁻² –10⁻⁴ разведений сливочного масла, кроме кисломолочного.

Вопросы для самопроверки:

1. Перечислить факторы, определяющие гигиеническое качество сырого молока.
2. В чем сущность метода определения количества микроорганизмов по редуктазной пробе?
3. Как определяется эффективность пастеризации молока?
4. Какие микробиологические показатели определяют при оценке качества питьевого молока?
5. Как готовят разведения молока для проведения микробиологического анализа?
6. Как проводят определение КМАФАнМ, количества грибов и дрожжей?
7. В чем сущность метода определения БГКП? Какие питательные среды используются в этом методе?
8. Микроорганизмы, обнаруживаемые в кисло- и сладкомолочном масле в различные периоды хранения.
9. Отбор и подготовка к исследованию проб масла.
10. Подготовка к микроскопированию мазков масла.
11. Микробиологические нормы оценки масла.
12. Определение Coli - титра кисло- и сладко-сливочного масла.

ЗАНЯТИЕ 4

САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения занятия: ПК-1 Способностью использовать нормативную и техническую документацию, регламенты, ветеринарные нормы и правила в производственном процессе;

ПК-5 Способностью организовывать входной контроль качества сырья и вспомогательных материалов, производственный контроль полуфабрикатов, параметров технологических процессов и контроль качества готовой продукции.

Цель занятия: ознакомить студентов с основными методами и показателями санитарно-микробиологической оценки кисломолочных продуктов.

Знание: классификации кисломолочных продуктов в зависимости от используемых для их производства микроорганизмов.

Умение: применять знания санитарно-микробиологических исследований состояния кисломолочных продуктов.

Владеть: методами контроля производства кисломолочных продуктов.

Оборудование и материал: кисломолочные продукты (болгарская простокваша, кефир, кефирные грибки), стерильные ложечки, нож, предметные и покровные стекла, пробирки диаметром 15 мм, пипетки на 5 мл, растворы красок, микроскоп, бактериологические петли, водяная баня, 40%-ный раствор КОН, культуры молочнокислых бактерий на плотных питательных средах.

Задание: 1. Сделать посеvy сметаны для определения броdivильного титра и количества дрожжей и плесеней.

2. Приготовить и просмотреть микроскопические препараты предложенных кисломолочных продуктов, зарисовать микроскопическую картину.

Содержание и методика работы

Санитарно-микробиологический контроль кисломолочных напитков

Обор проб для исследования кисломолочных напитков производится так же, как и при исследовании пастеризованного молока: после розлива отбирают по одному – два образца в упаковке от партии. Готовую продукцию контролируют на наличие бактерий группы кишечных палочек и по микроскопическому препарату не реже одного раза в пять дней. Для определения наличия БГКП кисломолочные продукты

предварительно нейтрализуют. Для этого отбирают стерильной пипеткой 10 см³ исследуемого продукта в стерильную колбочку и добавляют 1 см³ 10 %-го раствора двууглекислого натрия. Содержимое колбочки перемешивают и засевают в три пробирки со средой Кесслера по 1 см³ самого продукта, а также его первого и второго разведений. Для контроля состава микрофлоры готовых кисломолочных напитков просматривают микроскопические препараты, окрашенные метиленовым синим. В поле зрения препарата, приготовленного из йогурта, ряженки, простокваши «Мечниковской», «Южной», «Болгарской», должны находиться цепочки кокков и длинные тонкие палочки; из ацидофильно-дрожжевого молока – ацидофильные палочки и дрожжи; из кефира – стрептококки, короткие палочки, изредка единичные дрожжевые клетки и т. д. Микробиологические показатели кисломолочных напитков приведены в табл. 6.

Таблица 6. Микробиологические показатели кисломолочных напитков

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г	Масса продукта (г), в которой не допускаются			Дрожжи (Д), плесени (П), КОЕ/г, не более
		БГКП (коли- формы)	<i>S.</i> <i>aureus</i>	Патогенные, в том числе сальмонеллы	
Жидкие кисло-молочные продукты, в том числе йогурт, со сроками годности не более 72 ч	МКБ не менее ·10 ⁷	0,01	1,0	25	–
Жидкие кисло-молочные продукты, в том числе йогурт, со сроками годности более 72 ч:					
без компонентов	МКБ не менее ·10 ⁷	0,1	1,0	25	Д – 50*, П – 50
с компонентами	МКБ не менее ·10 ⁷	0,01	1,0	25	Д – 50*, П – 50
Жидкие кисло-молочные продукты, обогащенные бифидобактериями, со сроками годности более 72 ч	МКБ не менее 1·10 ⁷ ; бифидобактерии не менее 1·10 ⁶	0,1	1,0	25	Д – 50*, П – 50
Ряженка	–	1,0	1,0	25	–
Сметана и продукты на ее основе	МКБ не менее ·10 ⁷	0,001***	1,0	25	Д – 50***, П – 50***
Термически обработанные сквашенные молочные и молочные составные продукты без и с компонентами**	–	1,0	1,0	25	П – 50

* Кроме напитков, изготавливаемых с использованием заквасок, содер-жащих дрожжи.

** Для термически обработанных продуктов – 0,01.

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

Санитарно-микробиологический контроль сметаны

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

Сметану нейтрализуют добавлением 10 %-го раствора двууглекислого натрия до рН 6,5–6,8, а затем готовят десятикратные разведения продукта от 10–1 до 10–4 см³ для определения БГКП. С этой целью делают посев по 1 см³ указанных разведений сметаны в четыре пробирки со средой Кесслера. Бактерии группы кишечной палочки не должны обнаруживаться в 0,01–0,001 см³ продукта (см. табл. 3). В сметане со сроком годности более 72 ч определяют количество дрожжей и плесеней путем посева 1 г продукта и его первого разведения в чашки Петри с сушлом-агаром или средой Сабуро.

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

Санитарно-микробиологический контроль творога

При отборе творога из крупной тары (бочек, фляг) верхний слой продукта зачищают. Пробу отбирают стерильным щупом на расстоянии 3–5 см от края, направляя щуп к противоположной стороне и опуская примерно на 3/4 его длины. Из столбика творога на щупе отбирают стерильным шпателем 15–20 г творога и помещают в стерильную посуду, которую закрывают стерильной пробкой. От расфасованных продуктов отбирают один – два образца в упаковке. Для микробиологического анализа отвешивают 10 г продукта на стерильном часовом стекле (или чашке Петри) и тщательно растирают его в стерильной или профлампированной ступке. К навеске добавляют 90 см³ стерильного физиологического раствора, подогретого до 40–45⁰ С, и получают разведение продукта 1:10, из которого готовят все последующие разведения. Готовый творог анализируют на присутствие БГКП в определенной массе и просматривают микроскопический препарат. Бактерии группы кишечной палочки определяют посевом по 1 см³ разведений продукта от 10⁻¹ до 10⁻⁵ в пробирки со средой Кесслера. Про-

бирки с посевами выдерживают в термостате при температуре 37⁰ С в течение 18–24 ч, после чего их просматривают и определяют бродильный титр по наличию газообразования в поплавках. В микроскопическом препарате творога должны обнаруживаться молочнокислые стрептококки. Обнаруженные в препарате дрожжи, палочки, молочная плесень являются посторонними микроорганизмами. Микробиологические показатели творога приведены в табл. 7.

Таблица 7. Микробиологические показатели творога

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

Вопросы для самопроверки:

- 1 Как классифицируют кисломолочные продукты в зависимости от используемых для их производства микроорганизмов?
- 2 Какие микроорганизмы входят в состав закваски для кефира и кумыса?
- 3 Из каких видов микроорганизмов состоят закваски для творога, сметаны, простокваши, йогурта, варенца, ряженки?
- 4 Какими заквасками сквашивают молоко при производстве ацидофилина, ацидофильно-дрожжевого молока, ацидофильной пасты?
- 5 Как контролируют производство кисломолочных продуктов?

ЗАНЯТИЕ 5

САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРОВ, МОЛОЧНЫХ КОНСЕРВОВ, МОРОЖЕННОГО

Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения занятия: ПК-1 Способностью использовать нормативную и техническую документацию, регламенты, ветеринарные нормы и правила в производственном процессе;

ПК-5 Способностью организовывать входной контроль качества сырья и вспомогательных материалов, производственный контроль полуфабрикатов, параметров технологических процессов и контроль качества готовой продукции.

Цель занятия: ознакомить студентов с основными методами и показателями санитарно-микробиологической оценки сыров и молочных консервов.

Формирование:

Знание: показателей санитарно-микробиологического исследования сыров, молочных консервов, мороженого

Умение: применять знания санитарно-микробиологических исследований состояния сыров, молочных консервов, мороженого.

Владеть: методами контроля производство сыров, сгущенного молока, сухих молочных консервов и мороженого.

Оборудование и материал: шпатели, навески сыра, стерильные ступки, предметные и покровные стекла, растворы красок для окраски по Грамму, пробирки со стерильной водой, пробирки со стерильным молоком, бактериологические петли, микроскопы.

Задание: 1. Определить качество сырого молока по сычужно-бродильной пробе.

2. Приготовить навеску сыра и его разведения.

3. В пробе исследуемого сыра определить бродильный титр, количество маслянокислых бактерий, дрожжей и плесеней.

4. В сгущенном молоке с сахаром определить КМАФАнМ, количество протеолитических бактерий, бродильный титр.

5. В сухом молоке определить КМАФАнМ, количество протеолитических бактерий, бродильный титр.

Содержание и методика работы

Санитарно-микробиологическое исследование в сыроделии

При контроле процесса производства сыра исследуют сырое молоко, предназначенное для выработки сыра, закваску, сычужный фермент, пастеризованное молоко и сыр. В сыром молоке, поступающем на сыродельные заводы, кроме редуцтазной пробы и наличия ингибирующих веществ, один раз в 10 дней определяют общее число спор мезофильных анаэробных лактатсбраживающих бактерий и сычужно-бродильную пробу. В пастеризованной смеси молока из сырной ванны или сыроизготовителя не реже одного раза в 10 дней определяют общее число спор мезофильных анаэробных лактатсбраживающих бактерий и БГКП. Споры указанных бактерий не должны обнаруживаться в $0,1 \text{ см}^3$; БГКП должны отсутствовать в 3 см^3 молока.

Сычужно-бродильная проба

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

Чисто вымытые и высушенные широкие пробирки ополаскивают исследуемым молоком и наливают в них около 30 см^3 молока, затем в каждую пробирку вносят по 1 см^3 раствора сычужного фермента, хорошо перемешивают и ставят на 12 ч в термостат при температуре $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$. По истечении 12 ч пробы осматривают и относят молоко к одному из трех классов (табл. 8).

Таблица 8. Оценка качества молока по сычужно-бродильной пробе

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

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

Определение количества спор мезофильных лактатсбраживающих анаэробных бактерий

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

Микробиологический анализ готового сыра

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

Подготовка проб к анализу. Из взятого образца отвешивают 10 г на стерильном часовом стекле (чашке Петри, бюксе), переносят в стерильную или профламбированную ступку и тщательно растирают с небольшим количеством стерильной воды, добавляя стерильную воду, подогретую до $40\text{--}45^\circ\text{C}$ с таким расчетом, чтобы общий объем жидкости составил 90 см^3 . Содержимое ступки перемешивают и дополнительно растирают в течение 3–5 мин до получения тонкой суспензии. Суспензию (разведение сыра 10–1) переносят в колбу и закрывают стерильной пробкой. Из первого разведения готовят все последующие разведения, тщательно перемешивая суспензию. В сыре один раз в декаду после прессования, а также в процессе созревания определяют бродильный титр, количество маслянокислых бактерий и дрожжей. Для определения бродильного титра готовят разведения сыра от 10–1 до 10–4 и засевают их по 1 см^3 в пробирки со средой Кесслера. Для определения количества маслянокислых бактерий засевают по 1 см^3 первого, второго и третьего разведений сыра в пробирки с расплавленной средой СДА. После инкубации в течение 36–48 ч при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ подсчитывают количество выросших в пробирках колоний. Для определения количества дрожжей и плесеней делают посев по 1

см³ разведений сыра от 10–1 до 10–4 в чашки Петри с суслон-агаром. Бактерии группы кишечных палочек должны отсутствовать в 0,001 г доброкачественного сыра, содержание спор маслянокислых бактерий не должно превышать 100 в 1 г сыра.

Санитарно-микробиологическое исследование молочных консервов

Микробиологический контроль сгущенного молока с сахаром

Отбор пробы и подготовка к анализу. От каждой партии отбирают по две банки (одну банку до закатки, другую – после). Если продукт расфасован во фляги, то образцы отбирают из одной фляги от каждой партии. Банки со сгущенным молоком тщательно промывают щеткой в теплой воде и протирают. Перед вскрытием крышку банки тщательно фламбируют пламенем тампона из ваты, смоченного спиртом. Банки открывают стерильным консервным ножом. Отверстие банки немедленно закрывают стерильным пергаментом или стерильной крышкой чашки Петри. Из банки после перемешивания стерильной ложкой берут образец массой около 15 г и помещают в стерильную сухую колбу. Для анализа берут навеску массой 10 г, к которой добавляют 90 см³ стерильного физиологического раствора, подогретого до 40–45 °С, и взбалтывают в течение 3–5 мин. Из приготовленного таким образом первого разведения готовят все последующие.

Ход анализа. В сгущенном молоке с сахаром определяют:

- количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) в 1 см³ продукта – посевом 10⁻¹–10⁻³ разведений на МПА;
- количество протеолитических бактерий – посевом 10⁻¹–10⁻² разведений на молочный агар;
- количество дрожжей и плесеней – посевом 1 см³ продукта и его первого разведения на суслон-агар;
- наличие бактерий группы кишечной палочки – посевом 1 см³ продукта и его первого разведения в пробирки со средой Кесслера.

Бактерии группы кишечной палочки должны отсутствовать в 1,0 г доброкачественного сгущенного молока с сахаром; КМАФАнМ не должно превышать 2·10⁴ КОЕ/г.

Микробиологический контроль сухих молочных продуктов

Отбор проб и подготовка к анализу. Из бочки или мешка стерильной ложкой берут из разных мест образец сухого молока массой около 50 г и помещают в стерильную сухую тару, плотно закрывающуюся пробкой или крышкой. Если продукт расфасован в банки или ко-

робки, от каждой партии отбирают два образца в оригинальной упаковке. Из отобранного образца после тщательного перемешивания берут стерильной ложкой навеску массой 10 г и помещают в сухую стерильную колбу. К навеске добавляют 90 см³ стерильного физиологического раствора, подогретого до 40–45⁰ С, и взбалтывают в течение 3–5 мин. Из полученного первого разведения готовят все последующие.

Ход анализа. В сухих молочных продуктах определяют: – количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) в 1 см³ продукта – посевом 10⁻¹–10⁻³ его разведений на МПА; – количество протеолитических бактерий – посевом 10⁻¹–10⁻² разведений на молочный агар; – количество дрожжей и плесеней – посевом 1 см³ продукта и его первого разведения на сусло-агар; – наличие бактерий группы кишечной палочки – посевом 10⁻¹ и 10⁻² разведений продукта в пробирки со средой Кесслера. Бактерии группы кишечной палочки должны отсутствовать в 0,1 г доброкачественного сухого молока, КМАФАнМ не должно превышать 5·10⁴ КОЕ/г.

Исследование мороженого

С поверхности продукта стерильной ложечкой снимают навеску 50г. От расфасованного мороженого берут из упаковки один, два образца. Навеску мороженого расплавляют в стерильной склянке при 40–45⁰С в течение 10–15 минут и из этой пробы готовят разведения в стерильной воде 40–45⁰С. Посевы делают на МПЛ - разведения 1:1000, 1:10000, 1:100000. Титр кишечной палочки устанавливают путем посева разведений 1:10, 1:100 на среду Кесслера.

Посевы в чашках Петри на МПЛ выращивают в течение 3 суток при 30⁰С в термостате, на среде Кесслера - при 43⁰С.

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

Вопросы для самопроверки:

1. Отбор и подготовка для исследования проб сгущенного молока, сухого молока и мороженого.
2. Что представляют собой молочные консервы?
3. Какие микробиологические показатели определяют при контроле качества сгущенного молока?
4. Как контролируют производство сухих молочных консервов и мороженого?

ЗАНЯТИЕ 6

САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЯСА И МЯСОПРОДУКТОВ

Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения занятия: ПК-1 Способностью использовать нормативную и техническую документацию, регламенты, ветеринарные нормы и правила в производственном процессе;

ПК-5 Способностью организовывать входной контроль качества сырья и вспомогательных материалов, производственный контроль полуфабрикатов, параметров технологических процессов и контроль качества готовой продукции.

Цель занятия: ознакомиться с методами отбора проб мяса и мясных изделий для проведения бактериологического исследования.

Знание: микробиологических методов определения доброкачественности мяса и мясных продуктов

Умение: проводить бактериоскопический анализ мяса и мясо-продуктов

Владение: микробиологическими показателями оценки доброкачественность охлажденного, мороженого и соленого мяса

Оборудование и материал: микроскоп, предметные стекла, набор красок, спиртовки, стерильные ступки, пипетки, чашки Петри, вода, МПА. образцы продуктов, пробирки со стерильной водой, стерильные пипетки, чашки Петри, ступки и пестики, пинцеты, пробирки с питательными средами (МПА, среды Кесслер, Эндо, Китт-Тароцци, Вильсона-Блера), набор красителей, бактериальные петли.

Задание: 1. Провести бактериоскопический анализ свежего мяса. Сделать заключение о свежести исследованных проб мяса.

2. Провести бактериологический анализ свежего мяса. Сделать посевы на питательные среды для определения общего количества микробов (количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов – КМАФАнМ) и титра бактерий группы кишечных палочек (БГКП).

3. Ознакомиться с методами выявления в мясе возбудителей пищевых токсикоинфекций.

4. Изучить культуральные и морфологические свойства выросших на питательных средах колоний микроорганизмов. Описать выросшие колонии, приготовить из них фиксированные препараты, окрасить по методу Грама, зарисовать микрокартину. Сделать выводы о доброкачественности исследованных образцов.

Содержание и методика работы

Микробиологическое исследование свежего мяса

Микробиологическое исследование свежего мяса начинают микроскопического исследования мазков-отпечатков (бактериоскопический метод), а затем проводят бактериологический анализ.

Отбор проб. Для определения свежести мяса от каждой туши или полутуши отбирают для исследования три образца массой не менее 200 г каждый. Отбор производится целым куском из мышц бедра, лопатки и области 4–5 шейных позвонков. В образцах, кроме мышечной ткани, должны быть сухожилия и жир.

При бактериологическом исследовании на сибирскую язву направляют лимфатический узел, собирающий лимфу с места локализации пораженного очага, отечную ткань, а у свиней, кроме того, подчелюстной лимфатический узел.

Исследование на листериоз проводят на головном мозге, доле печени и почке.

При исследовании полутуши и четверти туши берутся кусок мышцы, лимфатические узлы и трубчатая кость.

Каждый образец упаковывают отдельно в пергаментную бумагу, где обозначаются дата и место взятия проб, а также вид животного, номер туши, причина и цель исследования. Затем образец отправляется в лабораторию.

Бактериоскопическое исследование

Бактериоскопический (микроскопический) метод – совокупность способов обнаружения и изучения морфологических и тинкториальных свойств бактерий (микробов) в лабораторных условиях. В лабораторной практике используют следующие типы микроскопических препаратов: препарат-отпечаток, висячую каплю, раздавленную каплю, тонкий мазок, фиксированный мазок.

Бактериоскопическое исследование мяса проводят в случае расхождения результатов между биохимическими и органолептическими методами оценки. Необходимость в бактериоскопическом исследовании свежести мяса отпадает в случае отрицательного результата при органолептическом анализе.

Из каждой пробы мяса необходимо приготовить не менее двух мазков-отпечатков.

Для приготовления мазка-отпечатка из поверхностного слоя (на глубине 2–3 см) стерильными ножницами или скальпелем вырезают кусочек мяса массой 2–3 г, прикладывают его внутренней срезанной стороной к предварительно профламбированной поверхности предметного стекла.

Для приготовления мазков-отпечатков мяса из глубоких его слоев поверхность пробы необходимо сначала простерилизовать (смочить спиртом и обжечь на пламени или прижечь нагретым металлическим шпателем). Затем стерильным инструментом вырезать из глубины небольшие кусочки мяса размером 2×1,5×2,5 см и сделать мазки-отпечатки.

Приготовленные на предметных стеклах мазки-отпечатки необходимо высушить на воздухе, зафиксировать в пламени горелки или спиртовки и окрасить по методу Грама. Каждый мазок-отпечаток просмотреть под микроскопом с иммерсионным объективом не менее чем в 25 разных полях зрения.

При микроскопировании в каждом просмотренном поле зрения подсчитывают отдельно число клеток бактерий (кокков и палочек) и дрожжей, результатом является среднее значение общего количества клеток по двадцати пяти полям зрения. В поле зрения микроскопа отмечается также наличие или отсутствие следов распада мышечной ткани.

Результаты микроскопирования оценивают в соответствии с данными, представленными в табл. 9.

Таблица 9. Оценка результатов бактериоскопического анализа мяса

Характеристика мяса	Микроскопическая картина
Свежее	Отсутствуют микробные клетки или видны единичные кокки и дрожжи (до 10 клеток); следов распада мышечной ткани нет
С частично измененной свежестью	Не более 30 кокков, дрожжей или палочковидных клеток; заметны следы распада мышечной ткани (ядра мышечных волокон в состоянии распада, исчерченность мышечных волокон слабо различима)
Несвежее	Более 30 микробных клеток с преобладанием палочковидных форм; наблюдается значительный распад мышечной ткани, почти полное исчезновение ядер и исчерченности мышечных волокон

Примечание. При обнаружении в мазках-отпечатках грамположительных палочек с обрубленными концами последние окрашивают 2 %-м раствором сафранина. Наличие в мазках, окрашенных сафранином, палочек или цепочек с капсулами свидетельствует о присутствии возбудителя сибирской язвы.

Бактериологическое исследование

Бактериологический метод заключается в выделении и идентификации чистой культуры возбудителя (популяции).

При отсутствии в мазках-отпечатках бактерий, сходных с сибиреязвенными, из образцов мяса и субпродуктов проводят посевы на питательные среды для выявления в них возбудителей пищевых токсикоинфекций (бактерий родов *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*), возбудителей зооантропонозов (бацилл сибирской язвы, бактерий листериоза, рожи свиней и др.) и анаэробов (патогенных и токсикогенных клостридий).

При бактериологическом исследовании каждую пробу освобождают от жировой и соединительной тканей, погружают в спирт, затем стерильными ножницами из глубины различных мест вырезают кусочки мяса размером 2,0×1,5×2,5 см. После этого вырезанные кусочки измельчают стерильными ножницами. Для посева составляют пробы массой 15 г. Одна проба состоит из кусочков мышц и лимфатических узлов, а другая – из кусочков паренхиматозных органов. Из каждой пробы в стерильной ступке готовят взвесь с содержанием в 1 см³ 0,5 г продукта.

Определение общего количества микробов (КМАФАнМ)

Общее количество микробов – это количество в 1 г продукта мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ). Метод определения основан на способности мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов размножаться на плотном питательном агаре при температуре 30 ± 1 °С в течение 72 ч. Количество засеваемого продукта устанавливают с учетом наиболее вероятного микробного обсеменения. При исследовании свежего мяса в питательную среду засевают разведения от 10⁻¹ до 10⁻³.

Для посева 0,1 г продукта (разведение 10⁻¹) готовят первое десятикратное разведение взвеси: стерильной пипеткой набирают 1 см³ взвеси, переносят ее в пробирку с 9 см³ стерильного физиологического раствора (1 см³ полученного раствора содержит 0,1 г продукта).

Для посева 0,01 г продукта (разведение 10⁻²) готовят второе десятикратное разведение: стерильной пипеткой перемешивают содержимое пробирки с первым разведением, набирают 1 см³ первого разведения и переносят в пробирку с 9 см³ стерильного физиологического раствора (1 см³ полученного раствора содержит 0,01 г продукта).

Для посева 0,001 г продукта (разведение 10⁻³) готовят третье десятикратное разведение: стерильной пипеткой перемешивают содер-

жимое пробирки со вторым разведением, набирают 1 см³ и переносят в пробирку с 9 см³ стерильного физиологического раствора (1 см³ полученного раствора содержит 0,001 г продукта).

В чашки Петри с заранее маркированной крышкой засевают по 1 см³ каждого разведения и заливают 10–15 см³ расплавленным и остуженным до 40–45 °С мясопептонным агаром (МПА). Сразу после заливки агара содержимое чашек Петри путем легкого покачивания тщательно перемешивают для равномерного распределения посевного материала. После застывания агара чашки Петри переворачивают крышками вниз и ставят на 72 ч в термостат при температуре 30 °С.

По окончании культивирования подсчитывают количество выросших на чашках с МПА колоний. При этом для подсчета колоний пользуются лупой с увеличением в 4–10 раз или специальным прибором. При большом числе колоний и их равномерном распределении в агаре на дно чашки Петри наносят четыре или более одинаковых секторов, подсчитывают число колоний в двух-трех секторах (но не менее чем на 1/3 поверхности чашки), находят среднее арифметическое число колоний и умножают на общее количество секторов всей чашки.

Количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов в 1 см³ свежего мяса (X) вычисляют по формуле

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

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

За окончательный результат принимают среднее арифметическое подсчета двух чашек с разными разведениями продукта.

Определение титра бактерий группы кишечных палочек (БГКП)

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

БГКП представляют собой мелкие, неспорообразующие палочки, располагающиеся одиночно, по методу Грама красятся отрицательно, подвижные (за исключением бактерий рода *Klebsiella*), не образующие спор и капсул (кроме бактерий рода *Klebsiella*), факультативные анаэробы. Имеют гетероферментативную каталазу и цитохромы, могут получать энергию как в процессе дыхания, так и в процессе брожения. Осуществляют муравьино-кислое брожение с накоплением CO₂ и H₂O и кислот (уксусной, молочной, янтарной).

Метод определения БГКП помогает обнаружить образование газа или кислоты в элективной питательной среде, содержащей лактозу (среда Кесслера). Метод учета БГКП получил название бродильного метода, сущность которого заключается в посеве определенного количества продукта или его разведений в жидкую питательную среду с последующим инкубированием при температуре 37 °С и обнаружении в поплавах газа с изменением цвета среды. При наличии газа на втором этапе исследования производят пересев материала из забродивших пробирок на среду Эндо. Для получения изолированной колонии пересев делается бактериальной петлей, густым штрихом. Чашки Петри с высевом инкубируются при температуре 27 °С в течение 24 ч, затем посевы просматриваются.

Если на среде Эндо не обнаружено характерных для БГКП ярких красных колоний с металлическим блеском или без него, то дают отрицательный ответ на это исследование. В таком случае анализ прекращают. При обнаружении на среде Эндо колоний определяется принадлежность выросших микроорганизмов к семейству кишечных бактерий. Для этого из колоний готовят фиксированный препарат и окрашивают его по методу Грама.

Обнаружение бактерий рода *Proteus*

Присутствие в свежем мясе в больших количествах бактерий рода *Proteus* свидетельствует о гнилостном разложении мясных белков. Биохимические свойства видов бактерий рода *Proteus* представлены в табл. 10. При микробиологическом контроле проводят суммарное определение всех видов бактерий рода *Proteus*.

Таблица 10. Биохимические свойства бактерий рода *Proteus*

Вид микроорганизма	Сбраживание углеводов					Разжижение желатина	Выделение сероводорода	Образование индола	Расщепление мочевины
	Лактоза	Глюкоза	Маннит	Сахароза	Мальтоза				
<i>P. vulgaris</i>	–	кГ	–	кГ	кГ	+	+	+	+
<i>P. mirabilis</i>	–	кГ	–	к	–	+	+	–	+
<i>P. rettgeri</i>	–	к	кГ	к	–	–	–	+	+
<i>P. morganii</i>	–	кГ	–	–	–	–	+	+	+

Примечание: кг – при сбраживании углеводов образуются кислота и газ;

к – при сбраживании углеводов образуется кислота.

Исследование проводится следующим образом: 0,5 см³ первого десятикратного разведения исследуемого мяса вносят в конденсационную воду свежескошенного МПА, не касаясь поверхности среды (метод Шукевича). Вертикально поставленные пробирки помещают в термостат и культивируют при температуре 37 °С в течение 18–24 ч.

В случае роста бактерий рода *Proteus* на скошенном МПА культура в виде вуалеобразного налета с голубым оттенком поднимается из конденсационной жидкости вверх по поверхности среды.

Из культуры готовят мазки, окрашивают их по Граму, определяют подвижность. Присутствие грамотрицательных подвижных (Н-форм) мелких палочек указывает на наличие бактерий рода *Proteus*.

Выявление бактерий рода *Salmonella*

Пищевые отравления, вызываемые бактериями рода *Salmonella*, занимают первое место среди микробных пищевых отравлений.

Навеску продукта объединенной пробы массой 25 г вносят во флакон, содержащий 100 см³ среды обогащения (Кауфмана, селенитовой или хлористо-магниевой «М»), и помещают в термостат для культивирования при температуре 37 °С. Через 16–24 ч делают посев из среды обогащения на среду Эндо, распределяя материал микробиологическим шпателем по поверхности среды. Посевы культивируют в течение 20–24 ч при температуре 37 °С. На среде Эндо сальмонеллы растут в виде круглых бесцветных или слегка розовых прозрачных колоний. Из подозрительных колоний готовят мазки и окрашивают их по Граму.

Выявление присутствия анаэробов

Берут 3–5 см³ приготовленной для посева взвеси (как описано выше), вносят в четыре пробирки со средой Кита–Тароцци, предварительно прогретой на кипящей водяной бане в течение 20–30 мин, затем охлаждают до 50 °С. Для выявления всех анаэробов две пробирки с посевами прогревают при 80 °С в течение 20 мин. При исследовании на *Cl. botulinum* типа Е одну пробирку подогревают в течение 15 мин до температуры 60 °С (при этом сохраняются споры *Cl. botulinum* типа Е), а другую оставляют непрогретой.

Для выявления *Cl. botulinum* типа Е посевы выдерживают при температуре 30 °С, а для обнаружения других анаэробов – при темпе-

ратуре 37 °С. Термостатирование проводят в течение 5–10 сут, наблюдение за ростом культур – ежедневно.

Выявление возбудителей зооантропонозов

Зооантропонозы – это инфекционные болезни, поражающие людей и животных. Термин «зооантропонозы» происходит от греческих слов *zoon* – животное, *anthropos* – человек и *nosos* – болезнь. Заражение людей происходит при уходе за больными животными, при переработке больного скота, а также при употреблении в пищу необезвреженных пищевых продуктов. К зооантропонозным инфекциям относятся сибирская язва, бруцеллез, туберкулез, сальмонеллез, лептоспироз, рожа свиней, листериоз, Ку-лихорадка, орнитоз, ящур, туляремия.

Для выявления возбудителей зооантропонозов из верхней части надосадочной жидкости пастеровской пипеткой или бактериологической петлей на поверхность МПА в чашки Петри вносят 1–2 капли приготовленной взвеси и растирают по поверхности питательной среды шпателем (метод Дригальского).

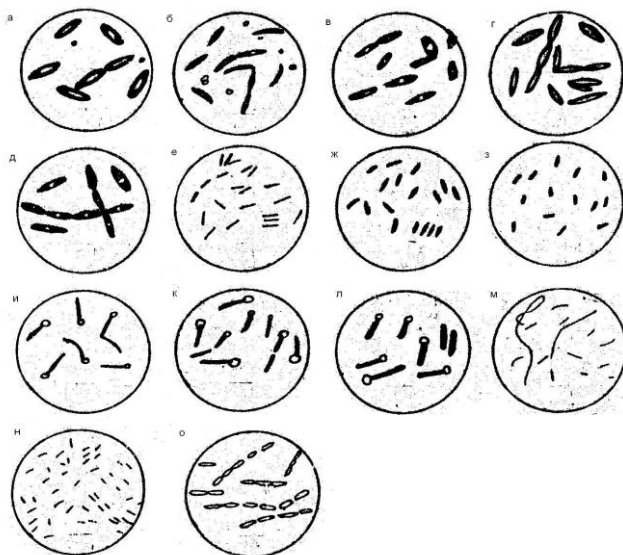


Рис. 8. Виды бактерий, вызывающих порчу мяса:
 а – *Bac.subtilis*; б – *Bac. mesentericus*; в – *Bac. megatherium*;
 г – *Bac. mycoides*; д – *Bac. cereus*; е – *Ps. fluorescens*;
 ж – *Ps. aeruginosa*; з – *Serratia marcescens*; и – *Cl. putrificum*;
 к – *Cl.sporogenes*; л – *Cl. perfringens*; м – *Proteus vulgaris*;
 н – *E. coli*; о – уксуснокислые бактерии

Микробиологическое исследование охлажденного, мороженого, соленого мяса и рассолов

Охлаждение, замораживание и посол – важные технологические операции, призванные сохранить качество мяса и мясопродуктов, придать им требуемые органолептические характеристики. На всех этапах этих технологических операций требуется проверка качества продукта при помощи микробиологического контроля.

Отбор проб. Для микробиологического исследования охлажденного и мороженого мяса отбираются образцы проб аналогично исследованию свежего мяса. Каждый из образцов соленого мяса имеет массу 400 г. Рассол отбирают в стерильные колбы вместимостью не менее 500 см³.

Порядок микробиологического исследования

Охлажденное мясо исследуют на общую микробную обсемененность, присутствие патогенных микроорганизмов, бактерий группы кишечных палочек, сальмонелл, стафилококков, сульфитредуцирующих клостридий, бактерий рода *Proteus*. Методика исследования аналогична методике микробиологического исследования свежего мяса.

На поверхности охлажденного мяса обычно доминируют психрофильные микроорганизмы рода *Pseudomonas* и др. Они составляют около половины общего количества выявленных в мясе бактерий. Это мелкие, подвижные, не образующие спор и капсул грамотрицательные палочки. В охлажденном мясе могут содержаться патогенные микроорганизмы в количестве не более: сальмонеллы – в 25 г продукта, БГКП – в 0,1 г, бактерий рода *Proteus* – в 0,01 г.

В мороженом мясе имеется незначительное количество микроорганизмов, так как часть неспорообразующих бактерий погибает при низкой температуре (от –23 до –25 °С). В процессе хранения мороженого мяса при температуре выше –10 °С могут развиваться отдельные виды плесневых грибов родов *Cladosporium* и *Thamnidium* и некоторые виды дрожжей, которые вызывают порчу продукта. При температуре хранения около –5 °С могут развиваться плесневые грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*.

Контроль содержания в мясе плесневых грибов и дрожжей проводится по общепринятым методикам, изученным в курсе общей микробиологии.

Качественный рассол содержит большое количество различных микроорганизмов. В процессе посола изменяется количественный и качественный состав микрофлоры рассола и мясопродуктов. В результате размножения микробов, приспособленных к условиям посола, общее количество микроорганизмов в рассоле в конце посола возрастает в десятки раз.

В соленом мясе (солонине) могут развиваться солеустойчивые (или галофильные) микроорганизмы. Обычно хлорид натрия действует на многие бактерии как консервант. При 12–15 %-й концентрации поваренной соли в среде размножаются галофилы, которые могут вызывать порчу продукта. Галофилами являются многие виды плесеней, некоторые дрожжи, многие пигментообразующие палочковидные бактерии.

Солеустойчивые микроорганизмы способны расти в средах с концентрацией соли 6–8 % и сохранять жизнеспособность в средах с высоким содержанием соли: 20 % и более.

В доброкачественной солонине и рассолах преобладают солеустойчивые молочнокислые бактерии, микрококки и некоторые виды грамотрицательных бактерий.

В доброкачественном рассоле БГКП не должны содержаться более чем в 50 мл, в заливочных рассолах после прогревания при 100 °С в течение 5 мин БГКП не должны содержаться в 500 мл, а споры анаэробных клостридий и аэробных бацилл – в 50 мл.

Определение влияния факторов внешней среды на микроорганизмы

Определение влияния на бактерии концентрации поваренной соли. В четыре пробирки со средой МПБ, содержащей 10, 15, 20 % NaCl и без него (контроль), прокаленной бактериологической иглой вносят по кусочку соленого мяса величиной со спичечную головку. Пробирки надписывают и помещают на 24–48 ч в термостат с температурой 25–30 °С.

По окончании термостатирования анализируют посевы (изменения, произошедшие с питательной средой, форму клеток и наличие спор). Степень мутности среды оценивают, пользуясь условными обозначениями: – отсутствие роста; + слабый рост; ++ умеренный рост; +++ обильный рост. Для идентификации выросших бактерий готовят фиксированный препарат. Окрашивают его метиленовой синью и микроскопируют.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие методы определения доброкачественности мяса относятся к микробиологическим?
2. В каком случае проводят бактериоскопический анализ мяса и мясopодуктов?
3. В чем заключается бактериологический анализ мяса?
4. По каким микробиологическим показателям оценивают доброкачественность охлажденного, мороженого и соленого мяса?
5. Какие микроорганизмы развиваются в охлажденном, а какие в соленом мясе?

ЗАНЯТИЕ 7

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛБАСНЫХ ИЗДЕЛИЙ И МЯСНЫХ КОНСЕРВОВ

Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения занятия: ПК-1 Способностью использовать нормативную и техническую документацию, регламенты, ветеринарные нормы и правила в производственном процессе;

ПК-5 Способностью организовывать входной контроль качества сырья и вспомогательных материалов, производственный контроль полуфабрикатов, параметров технологических процессов и контроль качества готовой продукции.

Цель занятия: ознакомиться с микробиологическим исследованием колбасных изделий, мясных консервов.

Формирование:

Знание: методики отбора проб колбас и мясных консервов для бактериологического исследования

Умение: проводить микробиологические исследования колбас и мясных консервов.

Владение: методикой учета результатов бактериологического исследования колбас и мясных консервов.

Оборудование и материалы: пробы колбасных изделий, стерильные инструменты (скальпель, пинцет, металлический шпатель), стерильная посуда, ступка с пестиком, чашка Петри, дозаторы на 1, 2, 5 и 10 см³, стеклянный шпатель, спирт, ватные тампоны, пробирки, МПА, среда Китта—Тароцци, среда обогащения Кауфмана или Киллиана, хлористо-магниевая среда “М”, среда Вильсон—Блера, чашки Петри со средой Эндо, Плоскирева, пробирки со стерильным физиологическим раствором по 9 см³, весы технические и разновесы, предметные стекла, набор красок для окраски бактерий по Граму, микроскопы, спирт-эфир, консервы (говяжья или свиная тушенка), спирт, пробойник, стерильные чашки Петри, ватные тампоны, стеклянные стерильные трубки, пинцеты, МПБ, водяная баня с термометром, микроскопы, реактивы и набор красок для окрашивания по Граму, предметные стекла, стерильная вода в колбах.

Задание:

1. Ознакомиться с методами отбора образцов колбасных изделий для проведения бактериологического исследования.

2. Провести посев из образцов колбасных изделий на питательные среды в соответствии с существующим ГОСТом.

3. Ознакомиться с методами отбора проб для микроскопического исследования консервов.

4. Ознакомиться с методикой микробиологического исследования консервов до и после стерилизации.

5. Провести посев на питательные среды из образцов мясных консервов после стерилизации в соответствии с ГОСТом.

Содержание и методика работы

Микробиологическое исследование колбасных изделий

Микробиологическое исследование колбасных изделий проводят при нарушении санитарного и технологического режимов производства или использовании сырья пониженного качества, несоответствии органолептических показателей продукции требованиям стандарта или технических условий, а также периодически для проверки соблюдения санитарного и технологического режимов производства продуктов.

Периодические исследования по предупредительному контролю соблюдения санитарного и технологического режимов колбасного производства проводят в следующие сроки:

для колбас фаршированных, ливерных, кровяных высшего, I и II сортов, зельцев высшего, I и II сортов — не реже 1 раза в 15 дней;

для колбас вареных высшего, I и II сортов, мясных хлебов, сосисок, сарделек — не реже 1 раза в 15 дней;

для колбас ливерных и кровяных III сорта, зельцев III сорта, студней и паштетов — не реже 1 раза в 5 дней;

для колбас полукопченых, варено-копченых и сырокопченых — не реже 1 раза в месяц;

для продуктов из свинины, говядины, баранины, мяса птицы и других видов убойных животных: вареных, запеченных, жареных — не реже 1 раза в 15 дней; копчено-вареных, копчено-запеченных, сырокопченых — не реже 1 раза в месяц.

Определение общего количества микробов; выделение сальмонелл, эшерихий, протей, стафилококков и сульфитредуцирующих анаэробов. Пробы для бактериологического исследования отбирают согласно ГОСТ 9792—73 от каждой партии (одного вида, сорта, наименования, выработанных в одной смене и др.). На пробы выписывают направление установленной формы, пробы хранят при температуре 4-6 С не более 4 ч с момента отбора.

Для бактериологического исследования колбасных изделий отбирают образцы длиной не менее 15 см; продуктов из говядины, баранины, свинины вареных, запеченных, жареных, сырокопченых — дли-

ной не менее 10 см; сосисок, сарделек — целыми единицами. Пробу продуктов без оболочки (хлеб) составляют из проб, отобранных из трех образцов. Пробу упаковывают в пергаментную бумагу, указывают сорт, вид изделия и помещают в водонепроницаемую тару. Вместе с пробами направляют акт отбора, в котором указывают наименование и время изготовления продуктов, цель исследования.

В зависимости от вида продукта объединенную пробу массой 50 г составляют следующим образом. Колбасные изделия в оболочке и продукты из свинины, баранины и говядины помещают в эмалированный тазик, протирают тампоном, смоченным спиртом, и обжигают над пламенем. Батоны разрезают стерильным скальпелем на две половины, не рассекая оболочки противоположной стороны батона. Пробу отбирают из нескольких участков центральной части и из-под оболочки обеих половин батона. Для посева берут стерильным инструментом кусочки фарша, которые помещают в предварительно взвешенную бюксу, и отвешивают на весах навеску массой 20 г (с погрешностью, не превышающей 0,1 г).

Навеску помещают в стерильную ступку и тщательно растирают стерильным пестиком, постепенно приливая 80 см³ стерильного физ. раствора с расчетом разведения материала в соотношении 1:10. После отстаивания при комнатной температуре в течение 15 мин 1 см³ приготовленной испытуемой взвеси высевают на питательные среды.

Бактериологическое исследование колбасных изделий включает определение общего количества микробов в 1 г продукта (этот метод не распространяется на сырокопченые колбасы), выявление бактерий родов *Salmonella*, *Escherichia*, *Proteus*, коагулазоположительных стафилококков и сульфитредуцирующих анаэробов. При оценке вареных и сырокопченых колбас, сосисок, сарделек и мясных хлебов по микробиологическим показателям необходимо руководствоваться следующими нормативами: наличие бактерий группы кишечных палочек (лактозосбраживающие) в 1 г, наличие сальмонелл в 25 г; наличие сульфитредуцирующих клостридий в 0,01 г продукта не допускается.

Определение общего количества микробов в 1 г продукта выполняют следующим образом. Из каждой пробы делают не менее двух посевов, чтобы на чашках Петри с МПА выросло от 30 до 300 колоний. На одну чашку Петри высевают 0,1 г, а на другую — 0,01 г продукта. Для посева 0,1 г продукта готовят первое десятикратное разведение взвеси, стерильной пипеткой набирают 5 см³ взвеси, переносят ее в пробирку с 5 см³ стерильного физиологического раствора или пептонной воды (1 см³ полученного раствора содержит 0,1 г продукта).

Для посева 0,01 г продукта готовят следующие разведения. Сте-

рильной пипеткой перемешивают содержимое пробирки, набирают 1 см³ и переносят в пробирку с 9 см³ стерильного физиологического раствора (1 см³ испытуемого раствора вторичного разведения содержит 0,01 г продукта).

Из приготовленных разведений вносят по 1 см³ раствора в стерильные чашки Петри и заливают 12...15 см³ расплавленного, охлажденного до 45-46 °С МПА, быстро смешивают с питательным агаром, осторожно вращая чашки по поверхности стола. После застывания агара его поверхность заливают слоем 2-3 мм холодного агара для предотвращения развития на поверхности протей. Чашки Петри переворачивают и помещают в термостат для культивирования микробов при 30 °С на 72 ч.

Для выявления бактерий рода *Salmonella* навеску продукта массой 25 г объединенной пробы вносят во флакон, содержащий 100 см³ среды обогащения (Кауфмана, селенитовой или хлористо-магниевой "М"), и помещают в термостат для культивирования при температуре 37 °С. Через 16...24 ч делают посев из среды обогащения на среду Эндо, распределяя материал шпателем по поверхности среды. Посевы культивируют при температуре 37 °С в течение 20...24 ч.

Для выявления бактерий группы кишечных палочек в среду Кесслера или хинозолбромкрезолпурпурную "ХБ" вносят 5 см³ испытуемой взвеси, помещают в термостат при 37 °С на 18...20 ч. При росте бактерий группы кишечных палочек на среде Кесслер в поплавке образуется газ, а среда "ХБ" приобретает желтый цвет.

Для приготовления среды "ХБ" в 1 см³ водопроводной воды растворяют 10 г пептона, 5 г хлорида натрия и 5 г маннита, кипятят 15...20 мин, устанавливают pH 7,4...7,6, фильтруют, вновь кипятят 10 мин и охлаждают до 60 °С. Добавляют стерильно 30 см³ дрожжевого автолизата, 15 см³ желчи крупного рогатого скота, 10 см³ раствора хинозола (1 100) и 10 см³ 1,6%-ного раствора спиртового бромкрезолового пурпурного. Среду разливают в пробирки по 7...8 см³. Цвет готовой среды — фиолетовый.

Для выявления бактерий рода *Proteus* в Н-форме 0,5 см³ анализируемой взвеси вносят в конденсационную воду свежекошенного МПА, не касаясь поверхности среды (метод Шукевича). Вертикально поставленные пробирки помещают в термостат при 37 °С и культивируют в течение 18...24 ч.

Выявление коагулазоположительных стафилококков: из взвеси (1:10) проводят посев по методу Дригальского на желчно-солевой агар (ЖСА), содержащий 6,5 % NaCl для выявления лецитиназной активности. Посевы термостатируют при температуре 37 °С в течение 24 ч.

Выявление сульфитредуцирующих клостридий: в пробирки, содержащие 9 см³ расплавленной и охлажденной до 45 °С среды Вильсон—Блера, вносят по 1 см³ десятикратных разведений (от 10⁻¹ до 10⁻⁷) взвеси исследуемого продукта. Тщательно перемешивают посевной материал, помещают в термостат и культивируют при 46 °С в течение 8...12 ч или при 37 °С в течение 20 ч. Появление в среде черных колоний или почернение среды свидетельствует о присутствии сульфитредуцирующих клостридий.

Для определения общего количества микробов в 1 г колбасных изделий подсчитанное количество колоний на чашках Петри с МПА умножают на степень разведения анализируемого продукта. За окончательный результат принимают среднее арифметическое подсчета двух чашек разной массы продукта.

Для определения бактерий группы кишечных палочек при обнаружении желтого цвета на среде “ХБ” или газа в поплавке на среде Кесслер проводят высев на чашки Петри со средой Эндо или Левина и помещают в термостат при 37 °С на 18...20 ч. Дальнейшее исследование ведут по методике бактериологического исследования мяса.

Выявление сальмонелл: на среде Эндо сальмонеллы растут в виде круглых бесцветных или слегка розовых прозрачных колоний. Из подозрительных колоний готовят мазки, окрашивают по Граму. В случае отсутствия роста на элективных средах и при наличии роста на средах обогащения посеvy пересевают из сред Кауфмана, Киллиана и других в чашки Петри со средой Эндо или Левина и термостатируют при 37 °С в течение 24 ч. В дальнейшем исследование проводят по методике бактериологического исследования мяса.

Выявление протей: на скошенном МПА культура поднимается из конденсационной жидкости вверх по поверхности среды в виде вуалеобразного налета с голубым оттенком. Из культуры готовят мазки, окрашивают их по Граму, определяют подвижность. Обнаружение грамтрицательных подвижных (H-форм) мелких палочек указывает на наличие бактерий рода протей.

Выявление коагулазоположительных стафилококков: на ЖСА колонии токсигенных стафилококков образуют “радужный венчик”. Из подозрительных колоний готовят мазки, окрашивают по Граму. Для подтверждения патогенности стафилококков ставят реакцию плазмокоагуляции. Наличие грамположительных стафилококков, давших положительную реакцию плазмокоагуляции и реакцию на лецитиназу, свидетельствует о присутствии токсигенных стафилококков.

Определение сульфитвосстановителей (*Cl. perfringens*, *Cl. sporogenes*): при росте клостридий сульфитвосстановителей на среде

Вильсон—Блера, на которой в результате восстановления сульфата натрия в сульфит натрия происходит взаимодействие с хлоридом железа, среда чернеет за счет образования сульфита железа. За положительный титр клостридий принимают то максимальное разведение взвеси, в посеве которой произошло почернение среды. Например, если характерные изменения наблюдаются в пробирках с разведением 10^{-2} , то считают, что в 1 г исследуемого продукта 10^2 микробных клеток.

Микробиологическое исследование консервов

Микробиологическое исследование консервов до стерилизации

Контроль выполняется в соответствии с инструкцией “О порядке санитарно-технического контроля консервов на производственных предприятиях, оптовых базах, в розничной торговле и на предприятиях общественного питания” (1973).

Бактериальную обсемененность содержимого консервных банок перед стерилизацией проверяют немедленно после закатки банок.

Для микробиологического исследования консервов до стерилизации отбирают три образца (банки) сразу после закатки.

В лаборатории банки тщательно моют теплой водой и вытирают. Крышку банки, смоченную спиртом, фламбируют. Банки открывают стерильным пробойником.

Пробы для анализа содержимого банок отбирают в зависимости от вида и консистенции продукта. Если консервы содержат большое количество заливки или бульона, то для высева берут непосредственно жидкую часть продукта. Если в консервах отсутствует жидкая фаза или имеется в незначительном количестве, то в продукт добавляют стерильную воду в соотношении 1:1 и высевают смыв с продукта без разбавления или из последовательно приготовленных разведений. При фасовании в тару вместимостью до 0,5 л содержимое банки перекладывают в стерильную банку (вместимостью 1,5...2 л) с таким же содержанием воды, закрывают крышкой и встряхивают в течение 3 мин, после чего отбирают пробу для посева. В зависимости от предполагаемого микробного обсеменения сырья пробу разводят с таким расчетом, чтобы в чашке с питательной средой выросло не более 300 колоний.

Микробиологические исследования банок перед стерилизацией включают определение общего количества микроорганизмов в содержимом банок, выявление спор облигатных анаэробов и термофильных бактерий (возбудителей плоскокислой порчи проводится только для консервов, содержащих неокисленные продукты — зеленый горошек, фасоль, кукурузу).

Общее количество микроорганизмов определяют ежедневно один раз в каждую смену на каждой линии и по каждому виду вырабатываемой продукции.

В каждом образце до стерилизации этот показатель не должен превышать в 1 г продукта следующих значений: 200 тыс. микробных клеток в мясе тушеном, 20 тыс. микробных клеток в мясо-растительных и сало-бобовых консервах при закладке мяса и фарша с предварительной тепловой обработкой, 50 тыс. микробных клеток в мясо-растительных консервах при закладке сырого мяса и фарша, 10 тыс. микробных клеток в мясном и печеночном паштете.

Для определения общего количества микробов в исследуемой пробе консервов делают посев 1 см^3 (г) продукта или его разведении в чашки Петри с МПА. Через сутки культивирования посевов при температуре 37°C подсчитывают число выросших колоний и определяют общую микробную обсемененность по формулам:

при посеве непосредственно продукта

$$X = \frac{a}{q}$$

при посеве смыва продукта

$$X = \frac{a \cdot 10^n \cdot V_{\text{вод.}}}{V_{\text{прод.}} \cdot q}$$

где x — количество микробов в 1 см^3 (г) продукта, a — число колоний, выросших на чашке, n — степень разведения продукта, $V_{\text{вод}}$ — объем воды в банке, $V_{\text{прод.}}$ — объем продукта в банке, q — объем посевного материала, внесенного в чашку, см^3 .

Наличие спор облигатных анаэробов в содержимом консервных банок до стерилизации выявляют с профилактической целью 1...2 раза в неделю по каждому виду вырабатываемой продукции; немедленно (на следующий день) — после установления повышенной бактериальной обсемененности консервируемого продукта до стерилизации.

При удовлетворительном санитарном состоянии технологических линий в содержимом консервных банок до стерилизации не должны обнаруживаться споры облигатных анаэробов.

Для выявления анаэробов из подготовленного для анализа образца стерильной трубкой или пипеткой отбирают примерно 10 см^3 продукта, вносят в стерильную пробирку и ставят на кипящую вода-

ную баню на 20 мин до достижения внутри пробирки 94..96 °С. После охлаждения 0,5 см³ прогретого продукта засевают в пробирку с накопительной средой Китта—Тароци. Посевы термостатируют при температуре 37 °С, спустя 48 ч после посева в среде отмечают газообразование и анаэробный рост. При наличии анаэробного роста из накопительных посевов 1...2 капли высевают в чашки Петри. Чашку Петри заливают 30 см³ расплавленного МПА с 1 % глюкозы. Сразу же после застывания агара на его поверхность пинцетом кладут стерильное предметное стекло так, чтобы под ним не было пузырьков воздуха. Затем чашку переворачивают крышкой вниз и ставят в термостат при температуре 37 °С.

Облигатные анаэробы выявляются на чашке под стеклом в центральной части в виде отдельных колоний или сплошного роста на расстоянии 3...4 мм от края стекла, образуя иногда под стеклом пузырьки газа. Факультативные анаэробы растут не только под стеклом, но и на всей поверхности среды в чашке.

Споры термофильных бактерий выявляют следующим образом: из предварительно прогретой пробы отбирают 5 см³ взвеси и вносят в 25 см³ МПА с 1 % глюкозы и 0,004 % бромкрезол-пурпура (среда должна иметь слабо-фиолетовую окраску). Посевы помещают в термостат при температуре 55 °С на 24...48 ч. Изменение окраски среды от фиолетовой до желтой или появление желтых ореолов вокруг колоний свидетельствует о наличии в исследуемой пробе термофильных бактерий.

Возбудителями плоскокислой порчи являются термофильные спорообразующие аэробные микроорганизмы: *Vac. stearothermophilus*, *Vac. aerothennophilus*, *Vac. coagulans* и др.

Vac. stearothermophilus — спорообразующая подвижная палочка, грамположительна, капсул не образует. Споры располагаются терминально.

Vac. aerothennophilus — крупная подвижная спорообразующая палочка, грамположительна, капсул не образует. Споры располагаются субтерминально.

Vac. coagulans — крупная подвижная палочка, образует споры, которые располагаются центрально или терминально, грамположительна.

Термофильные микроорганизмы, размножаясь в продукте в условиях хранения при повышенных температурах (40...70 °С), могут разлагать углеводы с образованием органических кислот без выделения газа. Они не вызывают бомбажа банок, но продукт приобретает кислый запах и неприятный кислый вкус.

Микробиологическое исследование консервов после стерилизации

Готовые консервы после стерилизации подвергают бактериологическому исследованию в следующих случаях:

обнаружение в партии повышенной микробной обсемененности или наличие спор облигатных анаэробов в содержимом банок перед стерилизацией;

отступление от технологических инструкций при изготовлении данной партии продукта;

закладка консервов на длительное хранение;

изготовление консервов на экспорт;

отсутствие показателя допустимой бактериальной обсемененности консервов до стерилизации.

Для бактериологического исследования готовой продукции согласно ГОСТ 87560—70 отбирают среднюю пробу от сменной выработки консервов одного наименования и одного размера тары. При фасовании консервов в жестяную или стеклянную тару вместимостью до 1 л отбирают две банки, которые завертывают в бумагу, опечатывают или пломбируют. Пробы сопровождают актом изъятия проб и этикеткой, на которой указывают наименование предприятия, выработавшего продукт, наименование, сорт и дату выработки продукта, дату отбора пробы, номер ГОСТа или технических условий на данный продукт.

В лаборатории образцы консервов осматривают — банки должны быть без дефектов (бомбаж, следы подтеков и т. д.). Их тщательно моют, вытирают полотенцем и проверяют на герметичность в сосудах с горячей водой либо в аппарате Бомбаго или Жадана. Для микробиологического исследования отбирают только герметичные банки. Отобранные консервы подвергают термостатной выдержке.

Для выявления жизнедеятельности мезофильных факультативно-анаэробных и анаэробных микроорганизмов мясные и мясо-растительные консервы, сосиски, ветчину, а также другие консервы с $pH > 4,4$ термостатируют при температуре $37 \pm 0,5$ °С.

Консервы в таре вместимостью 1 л и менее выдерживают в термостате в течение 5 сут, консервы вместимостью более 1л— 10 сут.

Для установления стерильности или выявления жизнедеятельности термофильных аэробных, факультативно-анаэробных и термофильно-анаэробных микроорганизмов овоще-мясные консервы для детского и диетического питания и другие консервы в таре любой вместимости термостатируют в течение 3 сут при $55 \pm 0,5$ °С. После термостатирования консервы выдерживают в течение 24 ч при комнатной температуре, после чего отмечают наличие дефектов тары.

Наряду с термостатной выдержкой из консервов, отобранных

для анализа, делают высевы на питательные среды, чтобы установить характер остаточной микрофлоры.

Банки вскрывают в специально приспособленном для проведения стерильных работ боксе. Ватным тампоном, смоченным спиртом, протирают крышку банки и фламбируют. После обжигания острием пробойника прокалывают отверстие в крышке банки. Отверстие должно иметь 1...1,5 см в диаметре. После вскрытия банки пробойник убирают и тотчас же высевают содержимое банки на питательные среды. Материал из банки берут стерильной стеклянной трубкой с внутренним диаметром 0,8 см (непосредственно перед высевом одну из трубок в пенале проверяют на стерильность). Посев проводят в асептических условиях. В каждой пробе должно быть немного жидкости (бульона) и плотных кусочков продукта (мяса, фарша и т. д.).

Для выявления мезофильных аэробных микроорганизмов из каждой банки по 2 см³ высевают в две пробирки МПБ с глюкозой. Посевы инкубируют в термостате с температурой 37 °С в течение 5 сут с ежедневным просмотром.

Для выявления анаэробов посев проводят в две пробирки со средой Китта—Тароци. Перед посевом для удаления растворенного кислорода среду регенерируют нагреванием, затем стеклянной трубкой в каждую пробирку вносят 2 см³ содержимого банки, засеянные пробирки выдерживают при температуре 37 °С в течение 5 сут, ежедневно контролируя рост культур.

Для выявления возбудителей ботулизма пробу консервированного продукта не менее 30 см³ или пробу жидкости 2 см³ высевают в четыре флакона с регенерированной средой Китта—Тароци. При этом проводят обработку посевов. Первый флакон прогревают при 80 °С в течение 30 мин, второй оставляют без прогрева и термостатируют при 37 °С. Третий флакон с посевом прогревают при 60 °С в течение 15 мин, а четвертый не прогревают. Посевы термостатируют при температуре 30 °С. За посевами наблюдают в течение 10 сут.

Для выявления коагулазоположительных стафилококков проводят посев на желточно-солевой агар. Методы посева и обнаружения коагулазоположительных стафилококков, а также сульфит-редуцирующих клостридий описаны в лабораторной работе “Микробиологическое исследование колбасных изделий”.

Учет результатов бактериологического исследования консервов

Для выявления мезофильных аэробных микробов при появлении признаков роста аэробных микроорганизмов (помутнение МПБ, образование пристеночного кольца или пленки и осадка) готовят мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют.

Если в мазках обнаруживают крупные грамположительные палочки или кокки, проводят высеv на МПА. Выросшие затем на МПА микробные колонии изучают в дальнейшем для идентификации микроорганизмов.

При выявлении в мазках мелких грамотрицательных неспорообразующих палочек из посевов делают высеvы на среду Эндо, скошенный агар по Шукевичу и на МПА с 1 % глюкозы; ставят каталазную пробу.

Мезофильные анаэробные микробы вызывают помутнение среды с выделением газа, в результате чего появляется посторонний запах, иногда разлагаются кусочки печени. При наличии роста микробов материал берут пастеровской пипеткой, готовят мазки и окрашивают по Граму. В мазках, содержащих облигатно-анаэробные бактерии, обнаруживают грамположительные спорообразующие палочки.

Для подтверждения принадлежности выявленных спорообразующих микроорганизмов к мезофильным облигатным анаэробам рода *Clostridium* проверяют отсутствие у них каталазы. Если каталаза не выявлена, то считают, что в посевах присутствуют мезофильные облигатно-анаэробные микробы рода *Clostridium*.

При обнаружении признаков роста микроорганизмов на среде Китта—Тароцци посеvы ввдерживают в термостате 6 сут, периодически отбирая из флаконов культуральную жидкость для анализа. Из культуры готовят мазки, окрашивают их по Граму. При наличии в среде возбудителя ботулизма отмечают помутнение среды, газообразование, маслянокислый запах. В мазках, окрашенных по Граму, обнаруживают грамположительные крупные палочки со спорами в виде ракеток. Если в консервированном продукте возбудитель находится в вегетативной форме, то видимый рост микроорганизмов можно наблюдать в непрогретых флаконах. Культуральную жидкость исследуют на наличие токсина и устанавливают его тип.

Токсигенные свойства культуры определяют путем постановки биопробы на белых мышах. Гибель мышей, получивших один фильтр-трат 7-дневной культуры, и выживание контрольной группы животных, которым вводили смесь фильтрата с антиботуллиническими сыворотками, свидетельствуют о наличии в испытуемой культуре ботуллинического токсина. Тип токсина устанавливают по реакции нейтрализации с типоспецифическими сыворотками (А, В, С, Е).

В случае выявления *Cl. botulinum* данная партия консервов считается непригодной в пищу, на что выдается заключение санитарно-эпидемиологической службы с предписанием об уничтожении. При выявлении клостридий других видов вопрос об использовании данной партии консервов решают местные органы санитарно-

эпидемиологической службы.

Вопросы для самопроверки:

1. В каких случаях проводят бактериологическое исследование колбасных изделий?
2. Какова методика отбора проб колбас для бактериологического исследования?
3. Как исследуют колбасы для выявления бактерий группы кишечных палочек, сальмонелл, протей, стафилококков, клостридий (сульфидредуцирующих)?
4. Каковы правила отбора и подготовки образцов консервов для бактериологического исследования?
5. С какой целью проводят бактериологическое исследование консервов до стерилизации?
6. Каковы цель и методика бактериологического исследования консервов после стерилизации?

ЗАНЯТИЕ 8

САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЯИЦ

Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения занятия: ПК-1 Способностью использовать нормативную и техническую документацию, регламенты, ветеринарные нормы и правила в производственном процессе;

ПК-5 Способностью организовывать входной контроль качества сырья и вспомогательных материалов, производственный контроль полуфабрикатов, параметров технологических процессов и контроль качества готовой продукции.

Цель занятия: ознакомить студентов с основными методами и показателями санитарно-микробиологической оценки яиц.

Знание: методов микробиологического исследования яиц

Умение: проводить отбор проб, определять КМАФАнМ, титра БГКП, выявление бактерий рода *Salmonella* и *Proteus*.

Владение: методикой учета результатов микробиологического исследования

Оборудование и материал: мерные стерильные пипетки, стерильные чашки Петри, чашки Петри с МПА, образцы яиц.

Задание:

1. Определить бродильный титр сырых яиц и меланжа.
2. Определить КМАФАнМ яичного порошка.

Содержание и методика работы

Санитарно-микробиологическое исследование яиц и яйцепродуктов

Нередко птицы являются скрытыми носителями инфекционных болезней, несут яйца, содержащие вирусы, бактерии, плесневые грибы, возбудителей сальмонеллеза и туберкулеза. Особую опасность представляют яйца водоплавающей птицы.

Яйца – скоропортящийся продукт, их необходимо хранить в условиях, которые обеспечивали бы замедленное протекание в них физико-химических и микробиологических процессов.

Скорлупа защищает яйца от проникновения микроорганизмов. Составляющие элементы яйца обладают разной степенью устойчивости к микробам. Наиболее устойчив к разложению и обсеменению белок, что объясняется содержанием в нем бактерицидных веществ: лизоцима, овидина, кональбумина, овомукоида, овомуцина и углекислоты.

Для производства меланжа используют яйца, отвечающие требованиям действующих нормативных документов. Нельзя использовать утиные, гусиные и известкованные куриные яйца, а также яйца, поступающие от инфицированных птиц.

Санитарно-микробиологическое исследование яиц и яичных продуктов проводят при контроле птицефабрик и пищевых производств. На каждую партию яиц и яйцепродуктов предприятием-изготовителем выдается санитарно-ветеринарное заключение об их безопасности и качестве.

Микробиологическое исследование яиц и яйцепродуктов, поступающих на мясное производство, проводят в тех случаях, когда при овоскопии возникает сомнение в их качестве, а также при наличии эпизоотических показателей (поступлении яиц из хозяйств, неблагополучных по сальмонеллезу и другим инфекционным болезням).

Отбор проб. Перед исследованием яйца протирают стерильным тампоном, а затем обжигают горящим ватным тампоном, смоченным спиртом. Затем вскрывают яйцо, пробивая скорлупу профламбированным инструментом (пинцетом или скальпелем), и отбирают содержимое градуированной стерильной пипеткой в необходимом для посевов количестве (раздельно белок и желток).

При контроле яичного порошка от каждой партии отбирают и вскрывают 10 единиц упаковки (при малом количестве не менее трех единиц). От каждой вскрытой единицы упаковки отбирают одинаковое количество яичного порошка и составляют среднюю пробу с таким расчетом, чтобы общая масса ее была около 250 г. Отобранную среднюю пробу тщательно перемешивают, помещают в стерильную сухую банку и плотно закрывают пробкой.

Для микробиологического исследования меланжа от каждой партии отбирают 3 % банок. С соблюдением правил асептики из каждой взятой для исследования банки отбирают по 50 г продукта. Пробы из разных банок помещают в общую стерильную посуду, тщательно перемешивают и из этой смеси отбирают для анализа среднюю пробу меланжа массой 50–55 г.

Яичный меланж перед исследованием размораживают в воде при температуре 45 °С. После размораживания яичную массу осторожно перемешивают стеклянной палочкой в течение 3 мин, не допуская пенообразования. Для исследования отбирают пробу градуированной стерильной пипеткой в необходимом для посевов количестве.

Бактериологическое исследование. Бактериологическое исследование яиц и яйцепродуктов включает в себя определение КМА-ФанМ, титра БГКП, выявление сальмонелл, протей, микроскопиче-

ских грибов.

Определение общего количества микробов (КМАФАнМ), титра БГКП, выявление бактерий рода *Salmonella* и *Proteus* проводятся по методике.

Определение общего количества микробов (КМАФАнМ)

Общее количество микробов – это количество в 1 г продукта мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ). Метод определения основан на способности мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов размножаться на плотном питательном агаре при температуре 30 ± 1 °С в течение 72 ч. Количество засеваемого продукта устанавливают с учетом наиболее вероятного микробного обсеменения. При исследовании яиц в питательную среду засевают разведения от 10^{-1} до 10^{-3} .

Для посева 0,1 г продукта (разведение 10^{-1}) готовят первое десятикратное разведение взвеси: стерильной пипеткой набирают 1 см³ взвеси, переносят ее в пробирку с 9 см³ стерильного физиологического раствора (1 см³ полученного раствора содержит 0,1 г продукта).

Для посева 0,01 г продукта (разведение 10^{-2}) готовят второе десятикратное разведение: стерильной пипеткой перемешивают содержимое пробирки с первым разведением, набирают 1 см³ первого разведения и переносят в пробирку с 9 см³ стерильного физиологического раствора (1 см³ полученного раствора содержит 0,01 г продукта).

Для посева 0,001 г продукта (разведение 10^{-3}) готовят третье десятикратное разведение: стерильной пипеткой перемешивают содержимое пробирки со вторым разведением, набирают 1 см³ и переносят в пробирку с 9 см³ стерильного физиологического раствора (1 см³ полученного раствора содержит 0,001 г продукта).

В чашки Петри с заранее маркированной крышкой засевают по 1 см³ каждого разведения и заливают 10–15 см³ расплавленным и остуженным до 40–45 °С мясопептонным агаром (МПА). Сразу после заливки агара содержимое чашек Петри путем легкого покачивания тщательно перемешивают для равномерного распределения посевного материала. После застывания агара чашки Петри переворачивают крышками вниз и ставят на 72 ч в термостат при температуре 30 °С.

По окончании культивирования подсчитывают количество выросших на чашках с МПА колоний. При этом для подсчета колоний пользуются лупой с увеличением в 4–10 раз или специальным прибором. При большом числе колоний и их равномерном распределении в агаре на дно чашки Петри наносят четыре или более одинаковых секторов, подсчитывают число колоний в двух-трех секторах (но не

менее чем на 1/3 поверхности чашки), находят среднее арифметическое число колоний и умножают на общее количество секторов всей чашки.

Количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов в 1 см³ свежего мяса (X) вычисляют по формуле

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

где n – количество колоний, подсчитанных на чашке Петри;

m – число десятикратных разведений.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое подсчета двух чашек с разными разведениями продукта.

Определение титра бактерий группы кишечных палочек(БГКП)

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

БГКП представляют собой мелкие, неспорообразующие палочки, располагающиеся одиночно, по методу Грама красятся отрицательно, подвижные (за исключением бактерий рода *Klebsiella*), не образующие спор и капсул (кроме бактерий рода *Klebsiella*), факультативные анаэробы. Имеют гетероферментативную каталазу и цитохромы, могут получать энергию как в процессе дыхания, так и в процессе брожения. Осуществляют муравьино-кислое брожение с накоплением CO₂ и H₂O и кислот (уксусной, молочной, янтарной).

Метод определения БГКП помогает обнаружить образование газа или кислоты в элективной питательной среде, содержащей лактозу (среда Кесслера). Метод учета БГКП получил название бродильного метода, сущность которого заключается в посеве определенного количества продукта или его разведений в жидкую питательную среду с последующим инкубированием при температуре 37 °С и обнаружении в поплавках газа с изменением цвета среды. При наличии газа на втором этапе исследования производят пересев материала из забродивших пробирок на среду Эндо. Для получения изолированной колонии пересев делается бактериальной петлей, густым штрихом. Чашки Петри с высевом инкубируются при температуре 27 °С в течение 24 ч, затем посеvy просматриваются.

Если на среде Эндо не обнаружено характерных для БГКП ярко-красных колоний с металлическим блеском или без него, то дают отрицательный ответ на это исследование. В таком случае анализ пре-

крашают. При обнаружении на среде Эндо колоний определяется принадлежность выросших микроорганизмов к семейству кишечных бактерий. Для этого из колоний готовят фиксированный препарат и окрашивают его по методу Грама.

Обнаружение бактерий рода *Proteus*

Присутствие в свежем мясе в больших количествах бактерий рода *Proteus* свидетельствует о гнилостном разложении мясных белков. Биохимические свойства видов бактерий рода *Proteus* представлены в табл. 10. При микробиологическом контроле проводят суммарное определение всех видов бактерий рода *Proteus*.

Исследование проводится следующим образом: 0,5 см³ первого десятикратного разведения исследуемого мяса вносят в конденсационную воду свежескошенного МПА, не касаясь поверхности среды (метод Шукевича). Вертикально поставленные пробирки помещают в термостат и культивируют при температуре 37 °С в течение 18–24 ч.

В случае роста бактерий рода *Proteus* на скошенном МПА культура в виде вуалеобразного налета с голубым оттенком поднимается из конденсационной жидкости вверх по поверхности среды.

Из культуры готовят мазки, окрашивают их по Граму, определяют подвижность. Присутствие грамотрицательных подвижных (Н-форм) мелких палочек указывает на наличие бактерий рода *Proteus*.

Выявление бактерий рода *Salmonella*

Пищевые отравления, вызываемые бактериями рода *Salmonella*, занимают первое место среди микробных пищевых отравлений.

Навеску продукта объединенной пробы массой 25 г вносят во флакон, содержащий 100 см³ среды обогащения (Кауфмана, селенитовой или хлористо-магниевой «М»), и помещают в термостат для культивирования при температуре 37 °С. Через 16–24 ч делают посев из среды обогащения на среду Эндо, распределяя материал микробиологическим шпателем по поверхности среды. Посевы культивируют в течение 20–24 ч при температуре 37 °С. На среде Эндо сальмонеллы растут в виде круглых бесцветных или слегка розовых прозрачных колоний. Из подозрительных колоний готовят мазки и окрашивают их по Граму.

Определение количества микроскопических грибов

Высевают в чашки Петри по 1 см³ из каждого приготовленного разведения и затем заливают расплавленным, охлажденным до температуры 45 °С суловым агаром или средой Сабуро. Посевы

культивируют в течение четырех суток при температуре 25 °С. В целях более точного учета количества плесневых грибов из выросших на питательной среде колоний, типичных для плесневых грибов по внешнему виду, выборочно готовят препарат «раздавленная капля» и изучают его под объективами сухой системы микроскопа.

Вопросы для самопроверки:

1. Чем обусловлена стойкость белка яйца к различным микробам?
2. Что включает в себя бактериологическое исследование яиц и яйцепродуктов?

ЗАНЯТИЕ 9

САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЫБЫ И РЫБНЫХ ПРОДУКТОВ

Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения занятия: ПК-1 Способностью использовать нормативную и техническую документацию, регламенты, ветеринарные нормы и правила в производственном процессе;

ПК-5 Способностью организовывать входной контроль качества сырья и вспомогательных материалов, производственный контроль полуфабрикатов, параметров технологических процессов и контроль качества готовой продукции.

Цель занятия: ознакомить студентов с основными методами и показателями санитарно-микробиологической оценки рыбы.

Формирование:

Знание: правил микробиологического исследования и возбудителей вызывающих порчу рыбы

Умение: проводить бактериоскопическое исследование рыбы и рыбных продуктов

Владение: бактериологическим методом исследования рыбы и рыбных продуктов и его учетом

Оборудование и материал: стерильные чашки Петри, чашки Петри с МПА, образцы рыбы.

Задание:

1. Провести бактериоскопический анализ свежей рыбы. Сделать заключение о свежести исследованных проб рыбы.

2. Провести бактериологический анализ рыбы-сырца. Сделать посеvy на питательные среды для определения общего количества микробов (количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов – КМАФАнМ и титра бактерий группы кишечных палочек (БГКП).

3. Ознакомиться с методами выявления возбудителей пищевых токсикоинфекций в рыбе.

Содержание и методика работы

Санитарно-микробиологическое исследование рыбы-сырца

Мышечный сок и мышечная ткань свежевывловленной здоровой рыбы считаются стерильными. Значительные количества бактерий обнаруживаются в покровной слизистой оболочке, на наружных жабрах и в желудочно-кишечном тракте.

Степень обсеменения рыбы бактериями зависит от окружающей среды и способа ее вылова.

В свежельовленной рыбе 60 % от всей микрофлоры составляют бактерии рода *Achromobacter*, остальные представители микрофлоры представлены бактериями родов *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium* и *Corynebacterium*.

Довольно часто пресные водоемы загрязняются сточными водами, поэтому пресноводные рыбы могут являться носителями патогенных для человека бактерий – сальмонелл, стафилококков и листерий.

Доброкачественность рыбы и рыбных продуктов определяют органолептическим, биохимическим и микробиологическим методами. К микробиологическим также относятся бактериоскопические и бактериологические методы.

Микробиологическое исследование рыбы-сырца начинают прежде всего с микроскопического исследования мазков-отпечатков (бактериоскопический метод), а затем проводят бактериологический анализ.

Отбор проб. Пробы для микробиологического исследования отбираются согласно нормативной документации, от каждой партии (одного вида, сорта, наименования и т.д.).

Количество единиц упаковки, подлежащих вскрытию, устанавливается действующими НТД производства (не менее 5 % или 5 единиц от общего количества в партии).

Перед отбором пробы необходимо осмотреть всю партию, вскрыть отдельные единицы упаковки, дать органолептическую оценку продукта и после этого отобрать пробу.

Пробы для микробиологических анализов отбирают стерильным инструментом в стерильную посуду.

Пробы мелкой рыбы, нерыбных объектов морского промысла, ястыков, молок и т. д. отбирают в количестве от 3 до 10 шт. из разных мест исследуемой партии и формируют среднюю пробу.

Среднюю пробу получают путем измельчения, перемешивания и растирания отобранных образцов.

Навеску отбирают в количестве 1 г (1 см^3) из средней пробы и постепенно добавляют к ней 9 г (9 см^3) жидкости (изотонический раствор хлорида натрия), получая исходное разведение 10^{-1} . Взвесь хорошо перемешивают или взбалтывают и оставляют при комнатной температуре на 3–5 мин. Затем исследуют надосадочную жидкость. При необходимости готовят последующие разведения, используя каждый раз новую пипетку.

Отбор средней пробы икры-сырца производится в ходе технологической операции из трех мест исследуемой партии общей массой

около 100 г. Отбор проб икры, расфасованной в бочки, проводят щупом из верхнего, среднего и нижнего слоев, от 3 % партии (не менее чем из 3 бочек). Разрезанные ястыки и молоки исследуют путем отбора 2–3 кусочков из разных мест общей массой около 100 г.

Крупную рыбу и крупные экземпляры нерыбных объектов морского промысла отбирают в количестве не более 3 шт. От каждого экземпляра из нескольких мест вырезают кусочки с кожей и мышцами, не затрагивая кишечник, площадью около 4 см², толщиной 4–5 мм и помещают в колбу для формирования средней пробы. После разделки и мойки рыбу и объекты морского промысла отбирают и вырезают небольшими кусочками массой не более 300 г.

Каждый образец упаковывают отдельно в пергаментную бумагу, ставят дату, место взятия проб, вид рыбы, причину и цель исследования и отправляют в лабораторию.

Для скоропортящихся продуктов, к которым относятся рыба и рыбные продукты, интервал времени между отбором проб и микробиологическим анализом составляет не более 6 ч в диапазоне температур от 0 до +4 °С.

Бактериоскопическое исследование. Бактериоскопический (микроскопический) метод – совокупность способов обнаружения и изучения морфологических и тинкториальных свойств бактерий (микробов) в лабораторных условиях.

Бактериоскопическое исследование рыбы и рыбных продуктов проводят в случае расхождения результатов между биохимическими и органолептическими методами оценки. Необходимость в бактериоскопическом методе отпадает в случае отрицательного результата оценки свежести рыбы и рыбопродуктов при органолептическом анализе.

Микроскопическое исследование рыбы-сырца осуществляют отдельно для поверхности рыбы и для ее внутренних тканей.

Исследование микрофлоры поверхности рыбы

К поверхности исследуемой рыбы прикладывают профламбированное предметное стекло и прижимают его в течение 1 мин. Стекло осторожно снимают, подсушивают, готовят фиксированный препарат и окрашивают по методу Грама. Готовый мазок просматривают под микроскопом с иммерсионным объективом в тридцати полях зрения.

Исследование микрофлоры внутренних тканей рыбы

В теле рыбы стерильным скальпелем делают надрез, осторожно вводят в него предметное стекло. С одной стороны стекло вытирают фильтровальной бумагой, мазок на другой стороне стекла сушат, фиксируют, окрашивают по Граму. Препарат просматривают в тридцати полях зрения под микроскопом с иммерсионным объективом.

Из глубины мышц также берут мазок-отпечаток. Для этого кожу посередине спины рыбы освобождают от чешуи и прижигают раскаленным скальпелем. Стерильными ножницами и пинцетом вырезают кусочек мяса на глубине 1–1,5 см общей площадью 2 см². Вырезанным кусочком делают несколько отпечатков. На предметное стекло кусочек прикладывают разными гранями на 1 мин. Препарат сушат, фиксируют, окрашивают по методу Грама и просматривают под микроскопом с иммерсионным объективом в тридцати полях зрения.

Из каждой пробы рыбы необходимо приготовить не менее двух мазков-отпечатков.

При микроскопировании в каждом просмотренном поле зрения подсчитывают отдельно число клеток бактерий (кокков и палочек) и дрожжей; результатом является среднее значение общего количества клеток по тридцати полям зрения. Отмечают также наличие или отсутствие в поле зрения микроскопа следов распада мышечной ткани.

Результаты микроскопирования оценивают в соответствии с данными, представленными в табл. 11.

Таблица 11. Оценка результатов бактериоскопического анализа рыбы

Характеристика рыбы	Микроскопическая картина
Свежая	Отсутствуют микробные клетки или видны единичные кокки и дрожжи (до 10 клеток); следов распада мышечной ткани нет
С частично измененной свежестью	Не более 30 кокков, дрожжей или палочковидных клеток; заметны следы распада мышечной ткани (ядра мышечных волокон в состоянии распада, исчерченность мышечных волокон слабо различима)
Несвежая	Более 30 микробных клеток с преобладанием палочковидных форм; наблюдается значительный распад мышечной ткани, почти полное исчезновение ядер и исчерченности мышечных волокон

Бактериологическое исследование. Бактериологический метод заключается в выделении и идентификации чистой культуры возбудителя (популяции).

Рыбу-сырец исследуют на общую микробную обсемененность, содержание бактерий группы кишечных палочек, присутствие сальмонелл, бактерий группы протей, энтерококков.

При бактериологическом исследовании каждую пробу освобождают от жировой и соединительной тканей, погружают в спирт, затем вырезают стерильными ножницами из глубины различных мест кусочки 2,0×1,5×2,5 см. Все вырезанные кусочки измельчают стерильными ножницами. Для посева составляют средние пробы по 15 г.

Определение общего количества микробов (КМАФАнМ)

Общее количество микробов – это количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) в 1 г (см^3) продукта. Метод определения КМАФАнМ основан на способности мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов размножаться на плотном питательном агаре при температуре 30 ± 1 °С в течение 72 ч. Количество засеваемого продукта устанавливают с учетом наиболее вероятного микробного обсеменения. При исследовании свежей рыбы в питательную среду засевают разведения от 10^{-1} до 10^{-4} .

Для посева 0,1 г продукта (разведение 10^{-1}) готовят первое десятикратное разведение взвеси: стерильной пипеткой набирают 1 см^3 взвеси, переносят ее в пробирку с 9 см^3 стерильного физиологического раствора (1 см^3 полученного раствора содержит 0,1 г продукта).

Для посева 0,01 г продукта (разведение 10^{-2}) готовят второе десятикратное разведение: стерильной пипеткой перемешивают содержимое пробирки с первым разведением, набирают 1 см^3 и переносят в пробирку с 9 см^3 стерильного физиологического раствора (1 см^3 полученного раствора содержит 0,01 г продукта).

Для посева 0,001 г продукта (разведение 10^{-3}) готовят третье десятикратное разведение: стерильной пипеткой перемешивают содержимое пробирки со вторым разведением, набирают 1 см^3 и переносят в пробирку с 9 см^3 стерильного физиологического раствора (1 см^3 полученного раствора содержит 0,001 г продукта).

Для посева 0,0001 г продукта (разведение 10^{-4}) готовят четвертое десятикратное разведение: стерильной пипеткой перемешивают содержимое пробирки с третьим разведением, набирают 1 см^3 и переносят в пробирку с 9 см^3 стерильного физиологического раствора (1 см^3 полученного раствора содержит 0,0001 г продукта).

В чашки Петри с заранее маркированной крышкой засевают по 1 см^3 каждого разведения и заливают 10–15 см^3 расплавленным и остуженным до 40–45 °С мясоептонным агаром (МПА). Сразу после заливки агара содержимое чашек Петри тщательно перемешивают путем легкого покачивания для равномерного распределения посевного материала. После застывания агара чашки Петри переворачивают крышками вниз и ставят на 72 ч в термостат при температуре 30 °С.

По окончании культивирования подсчитывают количество колоний, выросших на чашках с МПА. При этом используется лупа с увеличением в 4–10 раз или специальный прибор для подсчета колоний. При большом числе колоний и их равномерном распределении в агаре на дно чашки Петри наносят четыре или более одинаковых

секторов, подсчитывают число колоний в двух-трех секторах (но не менее чем на 1/3 поверхности чашки), находят среднее арифметическое число колоний и умножают на общее количество секторов всей чашки.

Количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов в 1 см³ свежей рыбы (X) вычисляют по формуле

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

где n – количество колоний, подсчитанных на чашке Петри;

m – число десятикратных разведений.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое подсчета двух чашек с разными разведениями продукта.

Определение титра бактерий группы кишечных палочек (БГКП)

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

БГКП представляют собой мелкие, неспорообразующие палочки, располагающиеся одиночно: по методу Грама красятся отрицательно, подвижные (за исключением бактерий рода *Klebsiella*), не образующие спор и капсул (кроме бактерий рода *Klebsiella*) факультативные анаэробы. Имеют гетероферментативную каталазу и цитохромы, могут получать энергию как в процессе дыхания, так и в процессе брожения. Осуществляют муравьино-кислое брожение с накоплением CO₂ и H₂O и кислот (уксусной, молочной, янтарной).

Метод определения БГКП основан на обнаружении образования газа или кислоты в элективной питательной среде, содержащей лактозу (среда Кесслера). Метод учета БГКП получил название бродильного метода, сущность которого заключается в посеве определенного количества продукта или его разведений в жидкую питательную среду с последующим инкубированием при температуре 37 °С и обнаружении в поплавках газа с изменением цвета среды. При обнаружении газа на втором этапе исследования производят пересев материала из забродивших пробирок на среду Эндо. Для получения изолированной колонии пересев делается бактериальной петлей, густым штрихом. Чашки Петри с высевом инкубируются в течение 24 ч при температуре 27 °С, затем посеvy просматриваются.

При отсутствии на среде Эндо характерных для БГКП ярких красных колоний с металлическим блеском или без него дают отрицательный ответ на наличие кишечных палочек и исследование прекращают. При обнаружении на среде Эндо колоний устанавливается принадлежность выросших микроорганизмов к семейству кишечных бак-

терий. Для этого из колоний готовят фиксированный препарат и окрашивают его по методу Грама.

Обнаружение бактерий рода *Proteus*

Присутствие в свежей рыбе большого количества бактерий рода *Proteus* свидетельствует о гнилостном разложении рыбных белков. Биохимические свойства видов бактерий рода *Proteus* приведены в табл. 10. При микробиологическом контроле проводят суммарное определение всех видов бактерий рода *Proteus*.

Оно проводится следующим образом: 0,5 см³ первого десятикратного разведения исследуемого образца свежей рыбы вносят в конденсационную воду свежескошенного МПА, не касаясь поверхности среды. Вертикально поставленные пробирки помещают в термостат и культивируют в течение 18–24 ч при температуре 37 °С.

В случае роста бактерий рода *Proteus* на скошенном МПА культура в виде вуалеобразного налета с голубым оттенком поднимается из конденсационной жидкости вверх по поверхности среды.

Из культуры готовят мазки, окрашивают их по Граму, определяют подвижность. Присутствие грамтрицательных подвижных (H-форм) мелких палочек указывает на наличие бактерий рода *Proteus*.

Выявление бактерий рода *Salmonella*

Пищевые отравления, вызываемые бактериями рода *Salmonella*, занимают первое место среди микробных пищевых отравлений.

Навеску продукта объединенной пробы массой 25 г вносят во флакон, содержащий 100 см³ среды обогащения (Кауфмана, селенитовой или хлористо-магниевого «М»), и помещают в термостат для культивирования при температуре 37 °С. Через 16–24 ч делают посев из среды обогащения на среду Эндо, распределяя материал микробиологическим шпателем по поверхности среды. Посевы культивируют в течение 20–24 ч при температуре 37 °С. На среде Эндо сальмонеллы растут в виде круглых бесцветных или слегка розовых прозрачных колоний. Из подозрительных колоний готовят мазки и окрашивают их по Граму.

Определение энтерококков

К группе *Enterococcus* относятся организмы, образующие сферические или слегка овальные клетки, практически всегда грамположительные, находящиеся в жидких средах в парах или в коротких цепочках, эндоспор не образуют, подвижность не типична, факультативные анаэробы, сбраживают разнообразные углеводы с образованием молочной кислоты, снижая pH до 4,2–4,6, каталазоотрицательные.

Из заранее приготовленных первого, второго и третьего разведений исследуемой рыбы на среду Эндо с полимиксином высевают по 0,1 см³ материала. Высеванный материал растирают стерильным шпателем по поверхности питательной среды. Посевы культивируют в термостате в течение 48 ч при температуре 37 °С. По окончании культивирования просматривают и подсчитывают количество колоний, выросших на чашках со средой Эндо. Типичные колонии энтерококков имеют округлую форму, ровные края, диаметр 1,5–2 мм, блестящую поверхность, ярко-красную окраску. Подсчитывают все типичные колонии; их число пересчитывают на 1 г продукта. Из типичных колоний готовят мазки, окрашивают по Граму, определяют каталазную активность.

Для определения каталазной активности на обезжиренное предметное стекло наносят каплю 1 %-го водного раствора перекиси водорода и в ней петлей растирают культуру. Если пузырьки газа не выделяются, реакция отрицательная.

В рыбе-сырце недопустимо наличие энтерококков в 0,01 г.

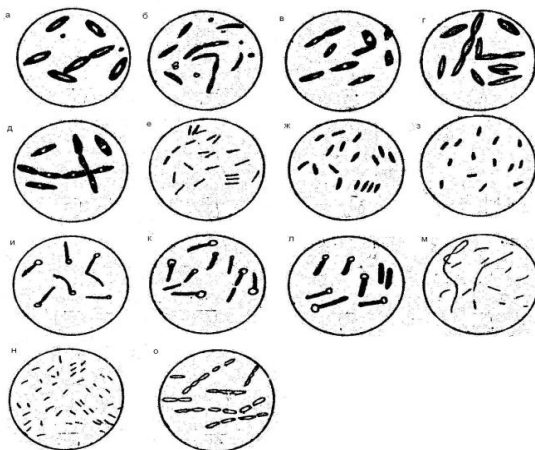


Рис.9. Виды бактерий, вызывающих порчу рыбы:
 а – *Bac.subtilis*; б – *Bac. mesentericus*; в – *Bac. megatherium*; г – *Bac. mycoides*;
 д – *Bac. cereus*; е – *Ps. fluorescens*; ж – *Ps. aeruginosa*; з – *Serratia marcescens*;
 и – *Cl. putrificum*; к – *Cl. sporogenes*; л – *Cl. perfringens*; м – *Proteus vulgaris*;
 н – *E. coli*; о – уксусно-кислые бактерии

Вопросы для самопроверки

1. Какие методы определения доброкачественности рыбы относятся к микробиологическим?
2. В каких случаях проводят бактериоскопический анализ рыбы и рыбопродуктов?

ЗАНЯТИЕ 10

САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ОБОРУДОВАНИЯ, ИНВЕНТАРЯ, ТАРЫ, РУК РАБОЧИХ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения занятия: ПК-1 Способностью использовать нормативную и техническую документацию, регламенты, ветеринарные нормы и правила в производственном процессе;

ПК-5 Способностью организовывать входной контроль качества сырья и вспомогательных материалов, производственный контроль полуфабрикатов, параметров технологических процессов и контроль качества готовой продукции.

Цель занятия: ознакомить студентов с основными методами микробиологического контроля оборудования, инвентаря, тары, рук рабочих и вспомогательных материалов.

Формирование:

Знание: правил микробиологического исследования контроля чистоты оборудования, инвентаря, тары и рук рабочего персонала.

Умение: проводить бактериоскопическое исследование смывов с оборудования, инвентаря, тары, рук обслуживающего персонала

Владение: бактериологическим методом исследования контроля оборудования, инвентаря, тары и рук обслуживающего персонала и его учетом.

Оборудование и материал: термостаты, микроскопы, спиртовки, плитки, пробирки с тампонами для приготовления смывов, пробирки со средой Кесслера, средой Кода, стерильные чашки Петри, стерильные пипетки на 1 см³, стерильные колбы на 500 см³, питательные среды: мясопептонный агар, сусло-агар или среда Сабуро, бактериологические петли, предметные стекла, набор красок по Граму, фильтровальная бумага.

Задание:

1. Сделать смывы с рук, оборудования и провести посевы на питательные среды для определения КМАФАнМ и выявления БГКП.
2. Сформулировать вывод о санитарно-гигиеническом благополучии исследованных объектов.
3. Сделать посевы на питательные среды из образцов вспомогательных материалов для определения их микробной обсемененности.
4. Изучить культуральные и морфологические свойства выросших на питательных средах микроорганизмов, определить КМА-

ФАНМ и титр БГКП.

5. Сделать вывод о пригодности исследуемых вспомогательных материалов для производства.

Содержание и методика работы

Санитарно-микробиологический контроль оборудования, инвентаря, тары и рук рабочих

Отбор проб и подготовка к исследованию. Для проведения исследования оборудования, аппаратуры, рук рабочих готовят стерильные ватные (марлевые) тампоны, закрепляют их на деревянном или металлическом стержне. Каждый тампон помещают в пробирку с 10 см^3 физиологического раствора (тампоном вниз) и стерилизуют при избыточном давлении 0,1 МПа в течение 20 мин.

Для измерения площади исследуемого объекта необходимо иметь металлические трафареты из нержавеющей стали размером $1,3 \times 5 \text{ см}$.

Перед взятием пробы трафарет смачивают спиртом, обжигают и накладывают на поверхность исследуемого объекта. Стерильным тампоном протирают ограниченную трафаретом поверхность и погружают тампон в ту же пробирку.

Пробы с рук берут без трафарета. Для этого стерильным влажным тампоном тщательно протирают ладонь, пальцы, пространство между пальцами и под ногтями, затем помещают тампоны в пробирку. Дальнейшее исследование ведут в лаборатории. В доставленную пробирку с пробой наливают 9 см^3 стерильной воды, получают разведение 1:10. Пробирку тщательно встряхивают в течение 3–5 мин.

Бактериологическое исследование. Бактериологическое исследование заключается в определении общего количества микробов и выявлении БГКП.

Определение общего количества микробов (КМАФАнМ)

Общее количество микробов – это количество в 1 г продукта мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ). Метод определения основан на способности мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов размножаться на плотном питательном агаре при температуре $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 72 ч. Количество засеваемого продукта устанавливают с учетом наиболее вероятного микробного обсеменения. При исследовании свежего мяса в питательную среду засевают разведения от 10^{-1} до 10^{-3} .

Для посева 0,1 г продукта (разведение 10^{-1}) готовят первое десятикратное разведение взвеси: стерильной пипеткой набирают 1 см^3 взвеси, переносят ее в пробирку с 9 см^3 стерильного физиологического раствора (1 см^3 полученного раствора содержит 0,1 г продукта).

Для посева 0,01 г продукта (разведение 10^{-2}) готовят второе десятикратное разведение: стерильной пипеткой перемешивают содержимое пробирки с первым разведением, набирают 1 см^3 первого разведения и переносят в пробирку с 9 см^3 стерильного физиологического раствора (1 см^3 полученного раствора содержит 0,01 г продукта).

Для посева 0,001 г продукта (разведение 10^{-3}) готовят третье десятикратное разведение: стерильной пипеткой перемешивают содержимое пробирки со вторым разведением, набирают 1 см^3 и переносят в пробирку с 9 см^3 стерильного физиологического раствора (1 см^3 полученного раствора содержит 0,001 г продукта).

В чашки Петри с заранее маркированной крышкой засевают по 1 см^3 каждого разведения и заливают $10\text{--}15 \text{ см}^3$ расплавленным и остуженным до $40\text{--}45 \text{ }^\circ\text{C}$ мясопептонным агаром (МПА). Сразу после заливки агара содержимое чашек Петри путем легкого покачивания тщательно перемешивают для равномерного распределения посевного материала. После застывания агара чашки Петри переворачивают крышками вниз и ставят на 72 ч в термостат при температуре $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

По окончании культивирования подсчитывают количество выросших на чашках с МПА колоний. При этом для подсчета колоний пользуются лупой с увеличением в 4–10 раз или специальным прибором. При большом числе колоний и их равномерном распределении в агаре на дно чашки Петри наносят четыре или более одинаковых секторов, подсчитывают число колоний в двух-трех секторах (но не менее чем на $1/3$ поверхности чашки), находят среднее арифметическое число колоний и умножают на общее количество секторов всей чашки.

Количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов в 1 см^3 свежего мяса (X) вычисляют по формуле

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

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

За окончательный результат принимают среднее арифметическое подсчета двух чашек с разными разведениями продукта.

Определение титра бактерий группы кишечных палочек (БГКП)

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

БГКП представляют собой мелкие, неспорообразующие палочки, располагающиеся одиночно, по методу Грама красятся отрицательно, подвижные (за исключением бактерий рода *Klebsiella*), не образующие спор и капсул (кроме бактерий рода *Klebsiella*), факультативные анаэробы. Имеют гетероферментативную каталазу и цитохромы, могут получать энергию как в процессе дыхания, так и в процессе брожения. Осуществляют муравьино-кислое брожение с накоплением CO_2 и H_2O и кислот (уксусной, молочной, янтарной).

Метод определения БГКП помогает обнаружить образование газа или кислоты в элективной питательной среде, содержащей лактозу (среда Кесслера). Метод учета БГКП получил название бродильного метода, сущность которого заключается в посеве определенного количества продукта или его разведений в жидкую питательную среду с последующим инкубированием при температуре 37 °С и обнаружении в поплавках газа с изменением цвета среды. При наличии газа на втором этапе исследования производят пересев материала из забродивших пробирок на среду Эндо. Для получения изолированной колонии пересев делается бактериальной петлей, густым штрихом. Чашки Петри с высевом инкубируются при температуре 27 °С в течение 24 ч, затем посеvy просматриваются.

Если на среде Эндо не обнаружено характерных для БГКП ярко-красных колоний с металлическим блеском или без него, то дают отрицательный ответ на это исследование. В таком случае анализ прекращают. При обнаружении на среде Эндо колоний определяется принадлежность выросших микроорганизмов к семейству кишечных бактерий. Для этого из колоний готовят фиксированный препарат и окрашивают его по методу Грама.

Санитарно-гигиеническое благополучие объекта устанавливают по отсутствию бактерий группы кишечной палочки. В смывах с оборудования, аппаратуры и рук рабочих БГКП присутствовать не должны.

Санитарно-микробиологический контроль вспомогательных материалов

Вспомогательные материалы – соль, сахар, пряности, растительное и сливочное масло, крупа и др. могут быть источником микробного обсеменения пищевых продуктов и вызывать их порчу. Поэтому каждая поступающая на пищевое производство партия вспомо-

гательных материалов подвергается тщательному микробиологическому контролю.

Отбор проб. Сыпучие материалы (сахар, соль, муку, крупу, сухие пряности и др.) отбирают в стерильную сухую посуду с соблюдением правил асептики из 5 единиц упаковок контролируемой партии. Пряности берутся в количестве 50 г, остальные ингредиенты – по 500 г.

Жидкие и пастообразные продукты отбирают из больших емкостей с разной глубины или берут одну пробу, предварительно тщательно перемешав содержимое ёмкости. На анализ отбирается около 500 см³ продукта.

Если продукты находятся в потребительской таре, то отбираются 3–5 единиц от каждой партии.

Бактериологическое исследование. Вспомогательные материалы исследуют на общую микробную обсемененность, присутствие БГКП и споровых микроорганизмов.

Определение общего количества микробов (КМАФАнМ), при наличии БГКП проводятся по методике, приведенной выше.

Выявление спор облигатных анаэробов

Из подготовленного для анализа образца стерильной пипеткой или трубкой отбирают 10 см³ продукта, вносят в стерильную пробирку и ставят на 20 мин в кипящую водяную баню. После охлаждения 0,5 см³ прогретого продукта засевают в пробирку с накопительной средой Кита–Тарощи. Посевы культивируют в течение 48 ч при температуре 37°C. По окончании культивирования отмечают наличие газообразования и анаэробного роста в накопительной среде. При установлении анаэробного роста в чашки Петри высевают 1–2 капли накопительных посевов. Чашки Петри заливают 30 см³ расплавленного МПА, содержащего 1% глюкозы. Сразу же после застывания агара на его поверхность пинцетом кладут стерильное предметное стекло так, чтобы под ним не было пузырьков воздуха. Затем чашку переворачивают крышкой вниз и ставят на 48 ч в термостат при температуре 37 °С.

Облигатные анаэробы выявляются в виде отдельных колоний или сплошного роста на чашке под стеклом в центральной его части на расстоянии 3–4 мм от края стекла. Под стеклом иногда образуются пузырьки газа. Факультативные анаэробы растут не только под стеклом, но и на всей поверхности среды в чашке.

Выявление спор термофильных бактерий

Из предварительно прогретой пробы отбирают 5 см³ взвеси и вносят 25 см³ МПА, содержащего 1 % глюкозы и 0,004 % бромкрезолпурпура (среда должна иметь слабо-фиолетовую окраску). Посевы

культивируют при температуре 55 °С в течение 24–48 ч. Изменение окраски среды от фиолетовой до желтой или появление желтых ореолов вокруг колоний свидетельствует о наличии в исследуемой пробе спор термофильных бактерий.

Возбудителями плоскокислотной порчи консервов являются спорообразующие аэробные микроорганизмы: *Bac. stearothermophilus*, *Bac. aerothermophilus*, *Bac. coagulans* и другие. Характеристика этих микроорганизмов представлена в табл. 12.

Термофильные микроорганизмы, размножаясь в продукте в условиях его хранения при повышенных температурах (40–70 °С), могут разлагать углеводы с образованием органических кислот без выделения газа. Они не вызывают бомбажа банок, но продукт приобретает кислый запах и неприятный кислый вкус.

Таблица 12. Характеристика некоторых видов бактерий, вызывающих плоскокислотную порчу консервов

Название микроорганизмов	Форма и расположение клеток	Отношение к окраске по Граму	Спорообразование	Подвижность	Капсулообразование	Отношение к кислороду
<i>Bac. stearothermophilus</i>	Крупная палочка	Гр ⁺	Споры располагаются терминально	+	–	Аэроб
<i>Bac. aerothermophilus</i>	Крупная палочка	Гр ⁺	Споры располагаются субтерминально	+	–	Аэроб
<i>Bac. coagulans</i>	Крупная палочка	Гр ⁺	Споры располагаются центрально или терминально	+	–	Аэроб

Вопросы для самопроверки

1. Почему необходим микробиологический контроль оборудования, инвентаря, тары и рук рабочих?
2. Как правильно сделать смыв с рук персонала?
3. Почему необходим тщательный микробиологический контроль вспомогательных материалов?
4. Что включает в себя бактериологическое исследование вспомогательных материалов?

Список используемой литературы

1. Ассонов, Н.Р. Микробиология / Ассонов Н.Р. – М.: Колос, 1997. – 352с.
2. Вербина, Н.М. Микробиология пищевых производств / Вербина Н.М., Каптерева Ю.В. – М.: Агропромиздат, 1988. – 256 с.
3. Долганова, Н.В. Микробиология рыбы и рыбных продуктов / Долганова Н.В., Першина Е.В., Хасанова З.К. – СПб.: Изд-во «Лань», 2012. – 288с.
4. Кисленко, В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология. Практикум / Кисленко В.Н. – СПб.: Изд-во «Лань», 2012. – 368 с.
5. Колычев, Н.М. Ветеринарная микробиология и иммунология / Колычев Н.М., Госманов Р.Г. – М.: КолосС, 2003. – 432 с.
6. Красникова, Л.В. Микробиология молока и молочных продуктов: Лабораторный практикум: Учеб.-метод. пособие / Красникова Л.В., Гунькова П.И., Маркелова В.В. - СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. 85 с.
7. Мудрецова-Висс, К.А. Микробиология, санитария и гигиена / Мудрецова-Висс К.А., Кудряшова А.А., Дедюхина В.П. – Владивосток: Изд-во ДВГАЭУ, 1997. – 312 с.
8. Мюнх, Г.Д. Микробиология продуктов животного происхождения / Мюнх Г.Д., Заупе Х, Шрайтер М.. – М.: Агропромиздат, 2985. – 592 с.
9. Саруханова, Л.Е. Санитарно-микробиологическое исследование объектов внешней среды (почвы, воды, воздуха): Учебно-методическое пособие / Саруханова Л.Е., Волина Е.Г. – М.: РУДН, 2010. – 17 с.
10. Сидоров, М.А. Микробиология мяса и мясопродуктов / Сидоров М.А., Корнелаева Р.П. – М.: Колос, 1996. – 240 с.

Учебное издание

Рябичева Ангелина Евгеньевна

Малявко Иван Васильевич

ОБЩАЯ САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

учебно-методическое пособие
для проведения лабораторных занятий студентами
по направлению 19.03.03 «Продукты питания животного происхождения»
профиль «Технология мяса и мясных продуктов»

Редактор Лебедева Е.М.

Подписано к печати 29.05.2015 г. Формат 60x84 ¹/₁₆.
Бумага офсетная. Усл. п. л. 5,75. Тираж 50 экз. Изд. № 3010.

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

