



***Филиал федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования «Аст-
раханский государственный технический университет» в
Ташкентской области Республики Узбекистан***

Факультет высшего образования

Кафедра ВБиТ

***Микробиологический контроль и безопасность производства продуктов из
сырья животного происхождения, водных биоресурсов и объектов
аквакультуры***

**лабораторный практикум для работы студентов направления 19.04.03 «Про-
дукты питания животного происхождения»**

Ташкентская область, Кибрайский район – 2025

Составитель: Цибизова М.Е., д.т.н., проф. кафедры ВБиТ

Рецензент: Бредихина О.В., д.т.н., профессор кафедры ВБиТ

Учебное пособие рассмотрено и одобрено на заседании кафедры ВБиТ (протокол от 21 февраля 2025 г. № 7).

ВВЕДЕНИЕ

Курс «Микробиологический контроль и безопасность производства продуктов из сырья животного происхождения, водных биоресурсов и объектов аквакультуры» знакомит студентов с микробиологическими основами технологии рыбных продуктов и продуктов животного происхождения, критериями их безопасности и микробиологической стойкости при хранении.

Лабораторные работы способствует закреплению теоретических знаний, развитию способности студентов разрабатывать мероприятия по снижению или предотвращению микробиологической порчи рыбных продуктов, организовывать микробиологический контроль производства рыбных продуктов, выполнять все виды микробиологических анализов.

Правила работы в микробиологической лаборатории

Во избежание контакта студента непосредственно с микроорганизмами необходимо соблюдение следующих правил.

1. Работа проводится обязательно в халатах и шапочках.
2. В помещении лаборатории необходимо особенно строго соблюдать порядок и чистоту. На рабочем столе не должно быть никаких посторонних предметов. Запрещается курение и прием пищи.
3. Во время посевов микроорганизмов нельзя разговаривать и ходить по лаборатории.
4. Необходимо соблюдать все технические приемы, описанные в методических указаниях.
5. Обязательно уничтожать после заворачивания в бумагу весь используемый в ходе работы микробиологический материал.
6. Работать в лаборатории следует только со стерильной посудой и инструментами.
7. Обязательно доводить до сведения преподавателя все случаи аварий с посудой, материалом или используемыми при посевах инструментами.

Настоящие методические указания предназначены для изучения целей, задач, методики проведения и анализа результатов основного и дополнительного микробиологического контроля за выпуском доброкачественной, безопасной в эпидемиологическом отношении пищевой продукции из рыбы.

Доброкачественность готового продукта в микробиологическом отношении в значительной степени зависит от санитарного уровня производства и микробиологической характеристики сырья и вспомогательных материалов, от четко организованного санитарно-микробиологического контроля.

В учебном пособии представлен санитарно-микробиологический контроль кулинарного, икорного, копильного производств, производства вяленой и соленой продукции, в том числе пресервов. Так же приведены методы

отбора проб и проведения микробиологических исследований, схемы контроля и допустимые показатели количества МАФAnM и отдельных микроорганизмов на различных этапах технологического процесса приготовления продукции.

Отбор проб и подготовка их к анализам

Отбор проб производят согласно ГОСТ 31904-2012 «Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний». Если на какой-то вид продукции нормы отбора проб отсутствуют, то объем и массу пробы определяют в соответствии с НТД на этот продукт, Инструкцией по санитарно-микробиологическому контролю производства пищевой продукции из рыбы и морских беспозвоночных № 5319-91 или ГОСТ ISO 7218-2015 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям».

В первую очередь отбирают пробы для микробиологических анализов, затем – для физико-химических и органолептических.

Количество единиц упаковки, подлежащих вскрытию, установлено действующими ГОСТами, ОСТАми, ТУ и другими нормативными документами на соответствующие продукты. Если на исследуемый продукт отсутствуют стандарты или ТУ, вскрывают 5 % единиц упаковки от общего количества в партии, но не менее 5 единиц. Перед отбором пробы готовой продукции необходимо осмотреть всю партию, вскрыть отдельные единицы упаковки, дать органолептическую оценку продукта (внешний вид, цвет, запах, консистенция, вкус) и только после этого отобрать пробу.

Пробы для микробиологических анализов отбирают стерильным инструментом (ножом, ложкой, щупом, пинцетом, пробоотборником) в стерильную посуду, закрытую двумя слоями бумаги и обвязанную бечевкой, или упаковывают в стерильную бумагу.

Пробы мелкой рыбы, нерыбных объектов морского промысла, ястыков, молок [и т.д.] отбирают в количестве 3-10 штук из разных мест исследуемой партии в предварительно взвешенную стерильную колбу, взвешивают и по разности устанавливают массу отобранной пробы.

Крупную рыбу и крупные экземпляры нерыбных объектов морского промысла отбирают в количестве не более трех штук. От каждого экземпляра из нескольких мест вырезают кусочки с кожей и мышцами, не затрагивая кишечник (за исключением отбора проб для определения паразитических вибрионов), площадью около 4 см², толщиной 4-5 мм и помещают в колбу.

Отбор средней пробы икры-сырца в ходе технологического процесса производится из трех мест исследуемой партии общей массой около 100 г.

Разрезанные ястыки исследуют путем отбора 2-3 кусочков из разных мест общей массой 100 г.

Рыбу, объекты морского промысла после разделки и мойки отбирают и вырезают небольшими кусочками массой не более 300 г, молоки – не более 100 г.

Пробы мороженой рыбы в целом виде или замороженных сырых полуфабрикатов, в том числе молоки и икру, отбирают из трех блоков (мест) по 2-3 кусочка (икру и молоки массой около 100 г). Для приготовления навески отобранные пробы дефростируют при температуре 2...5 °С. Навеску отбирают сразу после окончания дефростации, но не позднее чем через 18 ч после ее начала. Продукты однородной консистенции допускается размораживать при температуре 18...20 °С в течение 1 ч или в термостате при температуре 35 °С не более 15 мин.

Образцы мороженных фаршевых изделий (мороженный фарш) отбирают из трех брикетов (мест) по 2-3 кусочка из поверхностных слоев и внутренней части массой около 200 г в банку. Перед анализом пробы полностью размораживают при температуре 2...5 °С в той емкости, в которой они были доставлены в лабораторию.

Пробы рыбного фарша, приготовленного на производстве, отбирают из разных мест общей массой около 200 г.

Отбор проб икры, расфасованной в бочки, проводят шупом из верхнего, среднего и нижнего слоев. Для анализа отбирают до 3 % единиц расфасовки, но не менее, чем из трех бочек. Общая масса среднего образца должна составлять около 100 г.

Для определения сальмонелл в икре дополнительно берется навеска около 100 г.

Если пробы предполагается исследовать за пределами лаборатории предприятия, составляется акт отбора проб установленной формы, в котором указываются наименование продукта, номер партии, номер образца и дата отбора.

Для скоропортящихся продуктов интервал времени между отбором образцов и анализом должен быть сокращен до минимума. Такие образцы можно хранить при температуре от 0 до 4 °С не более 6 ч. В случае отбора проб в ходе технологического процесса интервал времени между отбором проб и исследованием также должен быть максимально сокращен.

Подготовку проб, разведения продуктов готовят согласно ГОСТ 26669-85 «Пищевые и вкусовые продукты. Подготовка проб для микробиологических анализов». Перед анализом из отобранной пробы готовят однородную массу путем измельчения, перемешивания, растирания. Способ измельчения зависит от вида продукта и его консистенции. Образцы измельчают ножницами или скальпелем, в электрических гомогенизаторах (микроизмельчителях) или ступках. Растирание продуктов твердой консистенции производят с помощью стерильного кварцевого песка.

Продукты, содержащие жиры, нагревают на водяной бане, в термостате или в сушильном шкафу до температуры 40...45 °С и перемешивают.

Навеску отбирают в количестве 1 г из усредненной подготовленной пробы и постепенно добавляют к ней 9 см³ жидкости для разведения, получая таким образом исходное разведение 10⁻¹.

Взвесь хорошо перемешивают или взбалтывают и оставляют при комнатной температуре на 3-5 мин. Затем исследуют надосадочную жидкость.

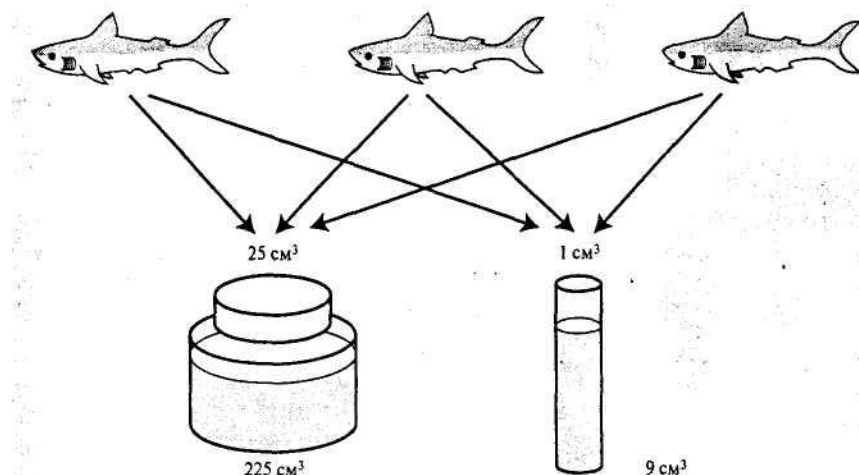


Рис.1. Схема отбора и подготовки проб к анализу

При необходимости готовят последующие разведения, при этом каждый раз используют новую пипетку. Для пищевых продуктов жидкой или полужидкой консистенции 1 см³ исследуемого продукта вносят в 9 см³ стерильной жидкости для разведения, получая исходное разведение (10⁻¹).

Для исследования на сальмонеллы и паразитические вибрионы пробы сырья и продукции из гидробионтов отбирают с частью кишечника и жабр. Из усредненной пробы берут навеску в 25 г.

В основном продукты разводят в пептонно-солевом или физиологическом растворе (изотоническом растворе хлорида натрия).

Массу пробы можно определять и объемным методом. Для этого берут специально подготовленные стаканы, на стенки которых наносятся нарезки на уровне 100 см³. В стакан наливают 90 см³ стерильной жидкости для разведения. Среднюю пробу размельченного продукта вносят в стаканы в количестве, обеспечивающем подъем жидкости до уровня нанесенной нарезки по нижнему мениску, получая разведение 10⁻¹.

Определение качества сырья бактериоскопическим методом

Исследование микрофлоры поверхности сырья

К влажной поверхности исследуемого сырья прикладывают стерильное предметное стекло и прижимают на 1-3 мин. Затем стекло осторожно снимают, подсушивают, готовят фиксированный препарат и окрашивают по Граму. Готовый мазок просматривают, подсчитывают все микроорганизмы в десяти полях зрения (объектив ×90 с иммерсией).

Исследование микрофлоры внутренних тканей сырья

В теле рыбы стерильным скальпелем делают надрез, осторожно вводят в него предметное стекло. С одной стороны стекло вытирают, мазок на другой стороне сушат, фиксируют, окрашивают по Граму. Препарат просматривают в десяти полях зрения (объектив $\times 90$ с иммерсией).

При взятии отпечатка из глубины мышц кожу посередине спины рыбы освобождают от чешуи и прижигают раскаленным скальпелем. Стерильными ножницами и пинцетом с глубины 1,0-1,5 см вырезают кусочек мышечной ткани общей площадью 2 см². Этим кусочком делают несколько отпечатков: к предметному стеклу его прикладывают разными гранями на 2-3 мин. Препарат сушат, фиксируют, окрашивают по Граму, а затем каждый просматривают и просчитывают в десяти полях зрения. В тетрадах отмечают наличие микробов, окраску и форму:

- отсутствие микробных тел в препаратах;
- единичные микроорганизмы в препарате;
- единичные микроорганизмы в поле зрения;
- множество микроорганизмов в поле зрения.

Рыба считается доброкачественной, если в ней не содержится микроорганизмов или в поле зрения встречаются единичные грамположительные бактерии.

В недоброкачественной рыбе с резким неприятным запахом увеличивается общее число микроорганизмов и процентное содержание грамотрицательных бактерий, уменьшается удельный вес кокковых форм.

Результаты подсчета обрабатывают статистически, используя формулу

$$A = x + S_x, \quad (1)$$

где A – общая бактериальная обсемененность; x – среднее арифметическое десяти полей зрения; S_x – стандартная средняя ошибка.

Определение качества сырья бактериологическим способом

Определение мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) определяют по ГОСТ 10444.15-94 «Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных и факультативно-анаэробных микроорганизмов». Метод основан на подсчете выросших на питательных средах при термостатировании посевов при температуре 37 °С в течение 72 ч колоний, видимых при двукратном увеличении.

Порядок выполнения работы

Перед работой стол и руки протирают спиртом. Рыбопептонный агар (РПА) расплавляют и остужают до 50 °С. Подготовленную пробу тщательно

перемешивают. Взвесь отстаивают в течение 5 мин. Надосадочную жидкость используют для приготовления последующих разведений.

В пробирку с 9 см³ стерильного раствора для разведений переносят 1 см³ исходного разведения (10⁻¹), не прикасаясь к поверхности жидкости в этой пробирке, перемешивают полый стерильной пипеткой, 1 см³ содержимого пробирки переносят в следующую (10⁻²) и т. д. В результате исследуемый продукт оказывается разведенным в 10, 100 и более раз. Степень разведения навески для высева на плотные среды выбирают так, чтобы общее количество колоний, выросших на чашке, колебалось в пределах от 30 до 300. В чашку Петри стерильной пипеткой вносят по 1 см³ разведенного продукта или смыва, заливают расплавленным и остуженным до 45 °С рыбопептонным агаром (15-20 см³), размешивают, вращая чашку по поверхности стола. На чашке указывают данные об анализе (номер пробы, разведение, дату посева). После застывания агара чашки переворачивают и помещают в термостат при температуре 37 °С на 72 ч.

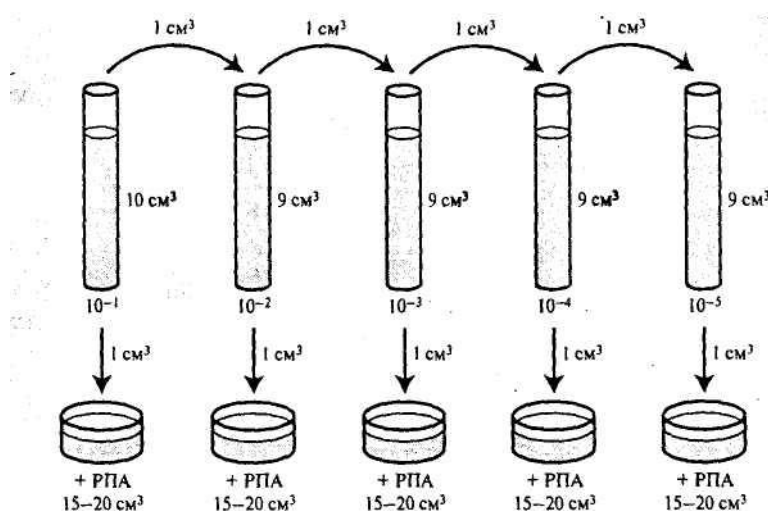


Рис.2. Схемы определения мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

Обработка результатов

Количество микроорганизмов в 1 г (1 см³, 1 см²) рассчитывают по формуле

$$K = \frac{AB}{C}, \quad (2)$$

где K — количество микроорганизмов в 1 г или 1 см³ или на 1 см², КОЕ; A — среднее арифметическое число колоний в чашке; B — разведение; C — масса (г), объем (см³), поверхность (см²).

Для определения среднего арифметического нельзя использовать данные о посевах, на которых количество выросших на чашках колоний менее 30. Если оказалось, что во всех разведениях на засеянных чашках выросло менее 30 колоний, в результатах анализа рекомендуется писать: «Количество микроорганизмов менее 1». Если на чашках более чем на половине их пло-

щади наблюдается рост спорообразующих микроорганизмов или за счет споровых микроорганизмов подсчет изолированных колоний невозможен, в результатах анализа следует писать: «Рост спорообразующих микроорганизмов». Результаты выражают в колониеобразующих единицах – КОЕ (г, см³, см²).

Определение бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)

Бактерии группы кишечных палочек (БГКП) имеют большое санитарно-гигиеническое значение. В этой группе определяют пять родов энтеробактерий: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serbia*. Особое место в этой группе занимают бактерии, которые являются показателем свежего фекального загрязнения, типичный представитель – *E. coli*.

Определение бактерий группы кишечных палочек проводят согласно ГОСТ 31747-2012 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий).

Бактерии группы кишечных палочек – анаэробные и факультативно-анаэробные, грамотрицательные, не образующие спор палочки, ферментирующие лактозу с образованием кислоты и газа при температуре 37 °С в течение 24 ч (бродильная проба), не обладающие оксидазной активностью, каталазоположительные, обычно цитратотрицательные, отрицательные по признакам образования H₂S, гидролиза мочевины и активности липазы.

Проведение исследований

В зависимости от требуемых пределов выявления x см³ жидкой пробы или x см³ исходной суспензии при использовании других продуктов переносят в пробирку, содержащую 10 см³ обогатительной селективной среды двойной концентрации, когда $1 \text{ см}^3 < x \leq 10 \text{ см}^3$, или в пробирку, содержащую 10 см³ обогатительной селективной среды нормальной концентрации, если $x \leq 1 \text{ см}^3$. В качестве обогатительной селективной среды используют лаурил-сульфат-триптозный бульон, бульон Мак-Конки или среду Кесслер.

Пробирки с посевами в среду двойной концентрации инкубируют при температуре (37±1) °С в течение (24±2) ч. Пробирки с посевами в среду нормальной концентрации инкубируют при температуре (37±1) °С в течение (24±2) ч. Если нет образования газа или помутнения, затрудняющего выявление газа, продолжают инкубацию еще (24±2) ч.

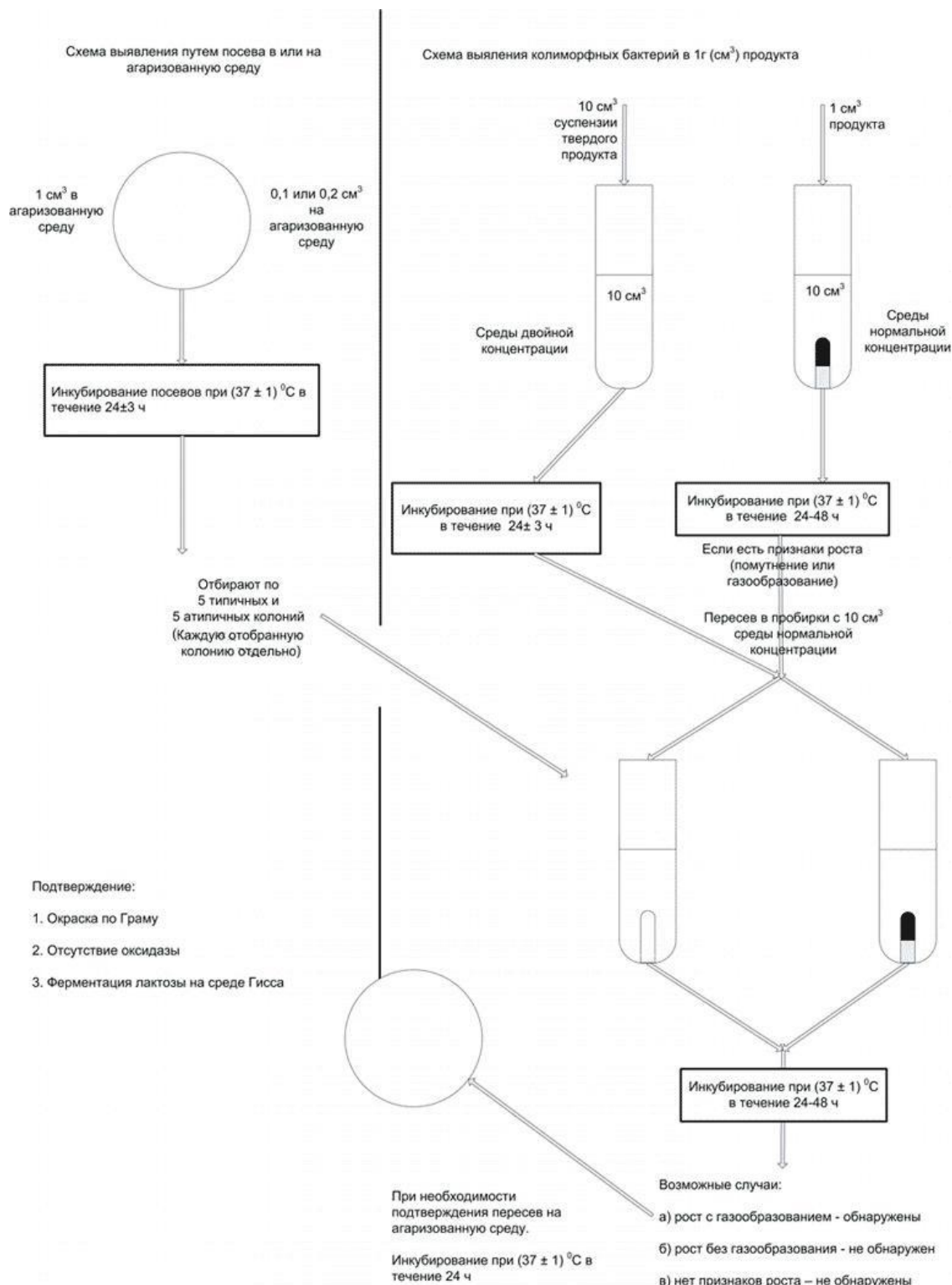


Рис. 3. Схема определения бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)

Из пробирок после инкубации инокулируют петлей, подтверждающую среду нормальной концентрации. Посевы инкубируют в термостате при температуре (37±1) °C в течение (24±2) ч, если нет образования газа, то продолжают наблюдение до (48±2) ч.

Пробирки, в которых отмечено образование газа после (24±2) ч или после (48±2) ч, считают положительными. При выявлении колиформных бактерий отмечают присутствие их в навеске x г или x см³ продукта.

При необходимости, для дополнительного подтверждения принадлежности бактерий, выросших на жидких средах (там, где отмечено газообразование), к колиформным бактериям делают пересевы по ГОСТ 26670 на поверхность одной из агаризованных селективно-диагностических сред (агар Эндо). Посевы инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 3) ч. После термостатирования отмечают рост типичных и атипичных колоний.

Для дополнительного подтверждения принадлежности выросших бактерий к колиформным бактериям отбирают не менее чем по пять типичных и атипичных колоний из чашек Петри с посевами. Атипичные колонии отбирают те, в которых подтверждено наличие колиформных бактерий посевом в жидкую подтверждающую среду.

На среде Эндо типичные колонии колиформных бактерий от розового до красного цвета, часто с металлическим блеском. Атипичные колонии отличаются от типичных по цвету и размеру. К атипичным относят также все типичные колонии, выросшие в результате ферментации сахаров, за исключением лактозы, содержащихся в пищевых продуктах. Такие колонии не будут принадлежать к колиформным бактериям.

Каждую отобранную для подтверждения колонию пересевают на поверхность скошенного питательного агара (ГРМ-агар), посевы термостатируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 3) ч.

Принадлежность к колиформным бактериям определяют по отношению к окраске по Граму, по отсутствию оксидазы, по ферментации лактозы на среде Гисса.

Определение бактерий вида *E. coli* проводят согласно ГОСТ 30726-2001 «Методы выявления и определения количества бактерий вида *Escherichia coli*». На среде Эндо *E. coli* образуют колонии от бледно-розового до темно-красного цвета часто с металлическим блеском.

Для подтверждения принадлежности выросших колоний к *E. coli* отбирают по три колонии каждого типа. Из отобранных колоний готовят мазки, окрашивают их по Граму (ГОСТ ISO 7218-2015 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям»). Параллельно у бактерий из каждой отобранной колонии убеждаются в отсутствии оксидазы (ГОСТ ISO 7218-2015 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям»).

Оксидазоотрицательные бактерии пересевают на поверхность мясопептонного агара или среды, приготовленной из сухого питательного агара. Посевы инкубируют до появления видимого роста при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$.

У оксидазоотрицательных грамотрицательных культур (палочки размером $1,1-1,5 \times 2,0-6,0$ мкм), выросших на среде Эндо, определяют возможность

образования индола, ацетона, сероводорода, утилизации цитрата, интенсивность ферментации углеводов с образованием кислоты, ферментацию сорбита, глюкозы и лактозы.

Определение образования индола

Культуру высевает в пробирку с бульоном Хоттингера или мясопептонным бульоном с триптофаном. Под пробку в пробирку помещают полоску индикаторной бумажки. Посевы инкубируют при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. Если за время инкубирования посевов в среде накапливается индол, то желтый цвет индикаторной бумажки изменяется от сиренево-розового до интенсивного малинового.

Образование индола можно определить с помощью реактивов Эрлиха и Ковача. Для этого к 5 см^3 24-часовой культуры добавляют 1 см^3 одного из реактивов. Образование красного слоя на поверхности культуральной жидкости указывает на положительную реакцию. *E. coli* образует индол.

Определение образования ацетона (реакция Фогес-Проскауэра)

Исследуемую культуру высевает в пробирки со средой Кларка. Посевы инкубируют при температуре $(36+1)^\circ\text{C}$ в течение 48 ч. После инкубирования посевов к 1 см^3 отобранной культуральной жидкости добавляют $0,6\text{ см}^3$ раствора α -нафтола и $0,2\text{ см}^3$ раствора гидроокиси калия. После добавления каждого реактива пробирку встряхивают. Появление розового окрашивания через 15-60 мин указывает на положительную реакцию. *E. coli* не образует ацетона.

Определение утилизации цитрата

Культуру высевает в пробирки со средой Козера или на поверхность среды Симмонса. Посевы инкубируют при температуре $(36+1)^\circ\text{C}$ в течение 24-48 ч. Изменение оливково-зеленого цвета среды на васильковый или синий указывает на положительную реакцию. *E. coli* не утилизирует цитрата.

Определение интенсивности ферментации углеводов с образованием кислоты (реакция с метил-рот)

Культуру высевает в пробирки с глюкозо-фосфатным бульоном или средой Кларка. Посевы инкубируют при температуре $(36+1)^\circ\text{C}$ в течение 48 ч. Затем к 5 см^3 культуральной жидкости добавляют 5-10 капель реактива Кларка. Окрашивание через 1 мин культуральной жидкости в красный цвет указывает на ферментацию углеводов до $\text{pH} < 5,0$. *E. coli* интенсивно ферментируют углеводы (реакция с метил-рот положительная).

Определение ферментации сорбита, глюкозы и лактозы

Исследуемую культуру высевает в пробирки со средой Гисса с сорбитом (глюкозой, лактозой). Посевы инкубируют при температуре $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч, пробирки со средой Гисса с лактозой – при температуре $(44\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. *E. coli* ферментирует глюкозу, лактозу и сорбит.

На ферментацию глюкозы в засеянных косяках трехсахарного агара или среде Клиглера указывает изменение цвета столбика среды и образование в

нем газа, на ферментацию лактозы – изменение цвета скошенной поверхности среды Клиглера, на ферментацию сорбита – изменение цвета среды. У культур, типичных для *E. coli* по всем изученным признакам, но не ферментирующих сорбит, определяют возможность ферментации целлобиозы на среде Гисса при температуре $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. *E. coli* не ферментирует целлобиозу; цвет среды не меняется.

Определение образования сероводорода

Образование сероводорода учитывают в посевах на среду Клиглера или трехсахарный агар после инкубирования посевов при температуре $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. Почернение в столбике среды указывает на образование сероводорода. *E. coli* не образует сероводорода.

Для биохимической идентификации выявленных бактерий допускается использование тест-систем промышленного производства.

Обработка результатов анализа

Результаты каждой пробы оценивают отдельно.

К бактериям *E. coli* относят оксидазоотрицательные, не образующие спор грамотрицательные палочки, ферментирующие лактозу при температуре $(44\pm 1)^\circ\text{C}$, а также глюкозу и сорбит, дающие положительную реакцию с метил-рот, образующие индол, не образующие ацетона и не утилизирующие цитрата. Бактерии, не ферментирующие сорбита и целлобиозы, но по другим биохимическим признакам давшие типичные для *E. coli* реакции, относят к сорбитотрицательным штаммам *E. coli*. Посевы навески продукта в жидкие среды считают положительными, если при последующем пересеве и подтверждении характерных колоний хотя бы в одной колонии будут обнаружены *E. coli*. Наиболее вероятное число (НВЧ) *E. coli* в 1 г (см^3) продукта определяют по количеству положительных колб (пробирок) по ГОСТ 26670-91. Если при подтверждении характерных колоний (при определении количества *E. coli* посевом «в» или «на» агаризованные среды) в 66 % случаев, [т. е.] не менее чем в двух из трех колоний, подтвержден рост *E. coli*, считают, что все характерные колонии, выросшие на чашке Петри, принадлежат к *E. coli*. В остальных случаях количество *E. coli* определяют исходя из процентного отношения подтвержденных колоний к общему количеству характерных колоний, взятых для подтверждения. Пересчет количества *E. coli*, определенного посевом «в» (или «на») агаризованные среды, на 1 г (см^3) продукта проводят по ГОСТ 26670-91. Результаты определения количества *E. coli* и выявления их в определенной навеске продукта оформляются в соответствии с ГОСТ 26670-91.

Определение золотистых стафилококков

Стафилококки – шарообразные, грамположительные, факультативные анаэробы, спор, капсул и жгутиков не образуют, вырабатывают каталазу, ле-

цитиназу, в анаэробных условиях сбраживают глюкозу до кислоты, оксидазо-отрицательные, коагулазоположительные. Эти свойства используют для их идентификации и отграничения от микрококков. Определение золотистого стафилококка проводят согласно ГОСТ 31746-2012 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus*. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus* посевом: в жидкую селективную среду (с предварительным обогащением) и на (в) агаризованные селективно-диагностические среды.

Методоснован на выявлении характерного роста бактерий на элективных средах, изучении морфологических свойств и постановке теста плазмокоагуляции.

Проведение исследований

При выявлении коагулазоположительных стафилококков в определенной навеске исследуемого продукта или его эквивалентном разведении с предварительным обогащением эту навеску или разведение вносят в одну из питательных сред (Жиолитти-Кантони бульон, солевой или сахарный бульон).

Посевы инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 2) ч. Если появилось почернение или черный осадок в Жиолитти-Кантони бульоне или помутнение в солевом или сахарном бульоне, то проводят подтверждение принадлежности выросших микроорганизмов к коагулазоположительным стафилококкам. Если почернения, черного осадка или помутнения нет, то посевы инкубируют еще (24 ± 2) ч. Для получения изолированных колоний стерильной петлей делают пересевы культур из каждого посева на поверхность чашки Петри с одной из агаризованных селективно-диагностических сред: Байрд-Паркер агара, Байрд-Паркер агара с кроличьей плазмой и бычьим фибриногеном, молочно-солевого агара, яично-желточно-азидного агара или яично-желточно-солевого агара.

Пересевы проводят также из пробирок, в которых нет видимых признаков роста.

Чашки Петри с пересевами инкубируют в термостате при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 2) ч или (48 ± 2) ч.

После 24 ч инкубирования чашек Петри отмечают присутствие типичных и атипичных для коагулазоположительных стафилококков колоний.

На Байрд-Паркер агаре после инкубирования в течение 24 ч коагулазоположительные стафилококки образуют типичные колонии черного или серого цвета, блестящие и выпуклые, окруженные прозрачной зоной, диаметр колоний около 1,0-1,5 мм и до 1,5-2,5 мм после инкубирования в течение 48

ч. После инкубирования в течение 24 ч непосредственно около колонии в прозрачной зоне может появиться опалесцирующее кольцо, окружающее колонию.

На Байрд-Паркер агаре с кроличьей плазмой и бычьим фибриногеном коагулазоположительные стафилококки образуют черные или серые, или ровные белые мелкие колонии, окруженные зоной преципитации, указывающей на коагулазную активность.

На молочно-солевом агаре колонии коагулазоположительных стафилококков круглые, слегка возвышающиеся над поверхностью агара, с ровными краями, диаметром 2,0-2,5 мм, окрашены в желтый, золотистый, лимонно-желтый, кремовый, палевый или белый цвет.

На яично-желточно-азидном и яично-желточно-солевом агаре колонии коагулазоположительных стафилококков окружены зоной лецитиназной активности.

Кроме типичных, коагулазоположительные стафилококки могут образовывать атипичные колонии.

После дополнительной инкубации всех чашек петри при температуре 37 °С в течение (24±2) ч фиксируют появление новых типичных и атипичных колоний.

Для подтверждения принадлежности типичных и атипичных колоний к коагулазоположительным стафилококкам отбирают не менее пяти типичных и/или атипичных колоний.

Для подтверждения принадлежности отобранных типичных и атипичных колоний к коагулазоположительным стафилококкам пересевают каждую отобранную колонию отдельно в жидкую среду (бульон на основе вытяжки сердца и мозга) и на поверхность одной из скошенных питательных сред – мясопептонного агара или среды, приготовленного из сухого ГРМ-агара.

Посевы инкубируют при температуре (37±1) °С в течение (24±3)ч.

Определение количества коагулазоположительных стафилококков посевом на агаризованную среду

Из навески продукта готовят исходное и ряд десятикратных разведений по ГОСТ 26669, таких, чтобы можно было определить в 1 г продукта предполагаемое количество коагулазоположительных стафилококков или их допускаемое количество, указанное в документе на исследуемый продукт.

Переносят с помощью стерильной пипетки 0,1-0,2 см³ исходной суспензии или соответствующего разведения на поверхность одной из сред: Байрд-Паркер агара, Байрд-Паркер агара с кроличьей плазмой и бычьим фибриногеном, молочно-солевого агара, яично-желточно-азидного агара или яично-желточно-солевого агара. для посева используют две параллельные чашки петри со средой. С помощью стерильного шпателя осторожно и быстро распределяют посевной материал по поверхности агаризованной среды в чашке Петри,

стараясь не касаться стенок чашки. Примерно в течение 15 минут дают подсохнуть поверхности среды под крышками.

Чашки Петри с посевами переворачивают крышками вниз и инкубируют в термостате при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24-48 ч.

После инкубирования чашки Петри с посевами просматривают и отмечают типичные и атипичные для коагулазоположительных стафилококков колонии. Все чашки Петри продолжают инкубировать при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 3) ч, после чего отмечают появление новых типичных и атипичных колоний.

Определение каталазы

На колонию микроорганизмов, взятую с поверхности питательной среды или извлеченную из нее и помещенную на предметное стекло, после 30 мин выдержки на воздухе пипеткой наносят каплю 3%-ного раствора перекиси водорода.

Если через 30-60 с на стекле появляются пузырьки газа, то считают, что они образовались в результате разложения перекиси водорода каталазой, образуемой микроорганизмами.

Если в посевах обнаружены газообразующие микроорганизмы, то при определении их каталазной активности ставят контрольную пробу аналогично пробе на каталазу, но без добавления перекиси водорода. Газообразующие микроорганизмы относят к каталазоположительным при отсутствии пузырьков газа в контрольной пробе или при явно повышенном газообразовании в пробе с перекисью водорода по сравнению с контрольной пробой.

Определение способности коагулировать плазму крови кролика

Способность коагулировать плазму крови кролика определяют у микроорганизмов, окрашивающихся положительно и образующих каталазу.

На Байрд-Паркер агаре с кроличьей плазмой и бычьим фибриногеном подсчитывают количество типичных колоний с зоной преципитации, указывающей на коагулазную активность, и эти колонии без дальнейшего подтверждения считают относящимися к коагулазоположительным стафилококкам.

Соблюдая правила асептики, в стерильные пробирки подходящего размера добавляют $0,1\text{ см}^3$ каждой культуры, выросшей на среде и $0,3\text{ см}^3$ плазмы кролика (если изготовителем кроличьей плазмы не установлены другие количества) и инкубируют при температуре 37°C .

Опрокидывая пробирку, исследуют плазму на свертывание после 4-6 ч инкубирования и, если тест отрицательный, просматривают через 24 ч инкубирования или исследуют после инкубационного периода продолжительностью, установленной изготовителем кроличьей плазмы.

Тест на коагулазу считают положительным, если культура показала, по крайней мере, 3+ - оценку коагулазной реакции, отмеченной на рисунке 4.

Реакцию на 1+ или 2+ оценивают как промежуточную.



Рис. 3. Результаты коагулазного теста

Для контроля качества каждой партии плазмы добавляют 0,1 см³ стерильного бульона на основе вытяжки из сердца и мозга к рекомендуемому количеству плазмы кролика и инкубируют без посева культуры микроорганизмов при температуре 37 °С, при этом в контролируемой плазме не должно быть признаков свертывания.

Определение сульфитредуцирующих клостридий (сульфитвосстановителей)

К группе санитарно-показательных клостридий относят сульфитредуцирующие, каталазоотрицательные, грамположительные, облигатные анаэробы, образующие споры палочки. Размер палочек 0,3-2,0×1,5-20,0 мкм, с закругленными концами, часто расположенные в парах или коротких цепочках. Как правило, плеоморфные. Чаще всего подвижные за счет перетрихальных жгутиков. Образуют овальные или сферические эндоспоры, обычно растягивающие клетки. Большинство видов хемоорганотрофны. Могут быть сахаролитическими, протеолитическими.

Сульфитредуцирующие клостридий определяют по ГОСТ 29185-2014 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета сульфитредуцирующих бактерий, растущих в анаэробных условиях». Методы выявления и определения количества сульфитредуцирующих бактерий основаны на высеве определенного количества продукта и (или) его разведения в плотные питательные среды, культивировании посевов в оптимальных условиях и, при необходимости, подсчета их количества и определения морфологических и биохимических свойств для подтверждения принадлежности сульфитредуцирующих бактерий к роду *Clostridium*.

Проведение исследований (рис. 5)

В две стерильные чашки Петри переносят 1 см³ испытуемой пробы, если она жидкая, или 1 см³ исходной суспензии и его десятикратного разведения в случае испытания других объектов. При выявлении сульфитредуцирующих бактерий в определенной пробе для анализа ее высевают в чашку Петри или пробирку.

Вносят в каждую чашку Петри 15 см³ железосульфитного агара. Время между инокуляцией чашек Петри и заливкой их питательной средой не должно превышать 15 мин. Тщательно перемешивают и инокулят со средой и дают застыть. После того как среда застынет, вносят от 5 до 10 см³ тоже среды для образования второго слоя.

Посевы инкубируют при температуре (37±1) °С в течение 24-48 ч.

Если выявляют термофильные бактерии, готовят другие посевы и инкубируют их при температуре (50±1) °С.

После 24-48 ч культивирования посевов подсчитывают количество колоний разной степени черной окраски. При выявлении сульфитредуцирующих бактерий в определенной массе или объеме пробы продукта для анализа подсчет количества выросших типичных колоний не проводят. Черные колонии, окруженные черной зоной, относят к сульфитредуцирующим бактериям.

Посчитывают колонии сульфитредуцирующих бактерий в каждой чашке Петри, где их количество менее 150, а количество всех выросших колоний не превышает 300.

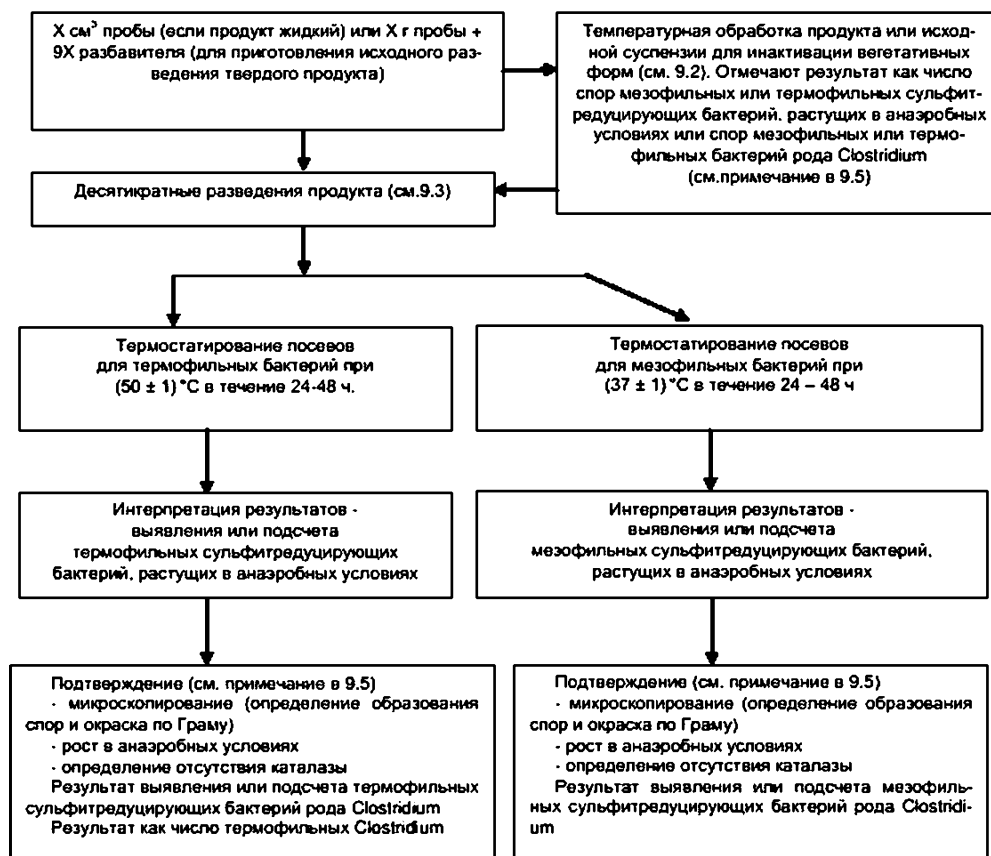


Рис.5. Схема определения сульфитредуцирующих бактерий

Подтверждение

Микроскопирование. Из выросших культур готовят два препарата и окрашивают первый по Граму, второй – для выявления бактериальных спор.

Определение каталазы. На колонию микроорганизмов, взятую с поверхности питательной среды или извлеченную из нее и помещенную на предметное стекло, после 30 мин выдержки на воздухе пипеткой наносят каплю 3%-ного раствора перекиси водорода.

Если через 30-60 с на стекле появляются пузырьки газа, то считают, что они образовались в результате разложения перекиси водорода каталазой, образуемой микроорганизмами.

Если в посевах обнаружены газообразующие микроорганизмы, то при определении их каталазной активности ставят контрольную пробу аналогично пробе на каталазу, но без добавления перекиси водорода. Газообразующие микроорганизмы относят к каталазоположительным при отсутствии пузырьков газа в контрольной пробе или при явно повышенном газообразовании в пробе с перекисью водорода по сравнению с контрольной пробой.

Подтверждение анаэробного роста. Подтверждение анаэробного роста проводят посевом по ГОСТ 30425 выросших культур, в чашки Петри под стекло или трубки Вейона, или инкубируют посеvy в анаэробных условиях. Для посева используют железосульфитную среду. Для сульфитредуцирующих бактерий рода *Clostridium* характерен анаэробный рост.

Допускается проводить определение отсутствия роста в аэробных условиях. При этом культуры высевают в чашки Петри на поверхность плотной питательной среды. Посевы инкубируют в аэробных условиях при температуре (37 ± 1) °С в течение 18-72 ч, а для выявления термофильных бактерий – при температуре (50 ± 1) °С.

Определение плесневых грибов и дрожжей

Плесневые грибы и дрожжи определяют согласно ГОСТ 10444.12-2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества дрожжей и плесневых грибов».

Сущность метода

Определенное количество исходной суспензии параллельно высевают в чашки Петри. Для посева десятикратных разведения используют дополнительные чашки Петри. Посевы в чашках Петри заливают расплавленной и охлажденной до (45 ± 1) °С плотной средой Сабуро. Параллельно с этим заливают в чашку Петри 15-20 см³ среды для проверки ее стерильности.

Чашки инкубируют в аэробных условиях при температуре (25 ± 1) °С в течение 5 суток. Через 3 суток инкубирования проводят предварительный учет количества выросших колоний, а через 5 окончательный.

Если в посевах на плотных средах присутствуют муковровые (быстро растущие грибы), то снятие предварительных результатов необходимо проводить очень осторожно, не допуская роста вторичных колоний.

При необходимости, если в посевах отсутствуют плесневые грибы и (или) дрожжи, то допускается оставлять посевы после 5 суток инкубирования при комнатной температуре на 1-2 суток.

В зависимости от цели испытания дрожжи и плесневые грибы подсчитывают по отдельности или вместе.

Рост дрожжей на плотных средах сопровождается образованием крупных, выпуклых, блестящих, серовато-белых колоний с гладкой поверхностью и ровным краем.

Развитие плесневых грибов на питательных средах сопровождается появлением мицелия различной окраски.

Для подсчета отбирают чашки, на которых выросло от 15 до 150 КОЕ дрожжей и (или) от 5 до 50 КОЕ плесневых грибов. Колонии подсчитывают. Отличие дрожжевых колоний от бактериальных устанавливают путем микроскопирования препаратов, приготовленных из этих колоний. Препараты готовят методом раздавленной капли.

Определение бактерий рода *Salmonella*

Метод основан на способности бактерий рода сальмонелл образовывать на дифференциально-диагностических средах специфические колонии и давать реакцию агглютинации с сальмонеллезными сыворотками. Определение бактерий рода *Salmonella* проводят согласно ГОСТ 31659-2012 (ISO 6579:2002) Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*.

Проведение исследований

К бактериям рода сальмонелл относятся грамотрицательные палочки с закругленными концами, длина которых варьирует от 2 до 5 мкм, ширина – от 0,7 до 1,5 мкм. Обычно подвижны благодаря наличию перитрихальных жгутиков. Факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы, обладают и дыхательным и бродильным типами метаболизма. Оптимальная температура роста 37 °С, реакция среды слабощелочная (рН 7,2-7,4). Оксидазоотрицательные, каталазоположительные, индол отрицательные. Образуют H₂S. Реакция Фогес-Проскауера отрицательная. Мочевины не гидролизуют.

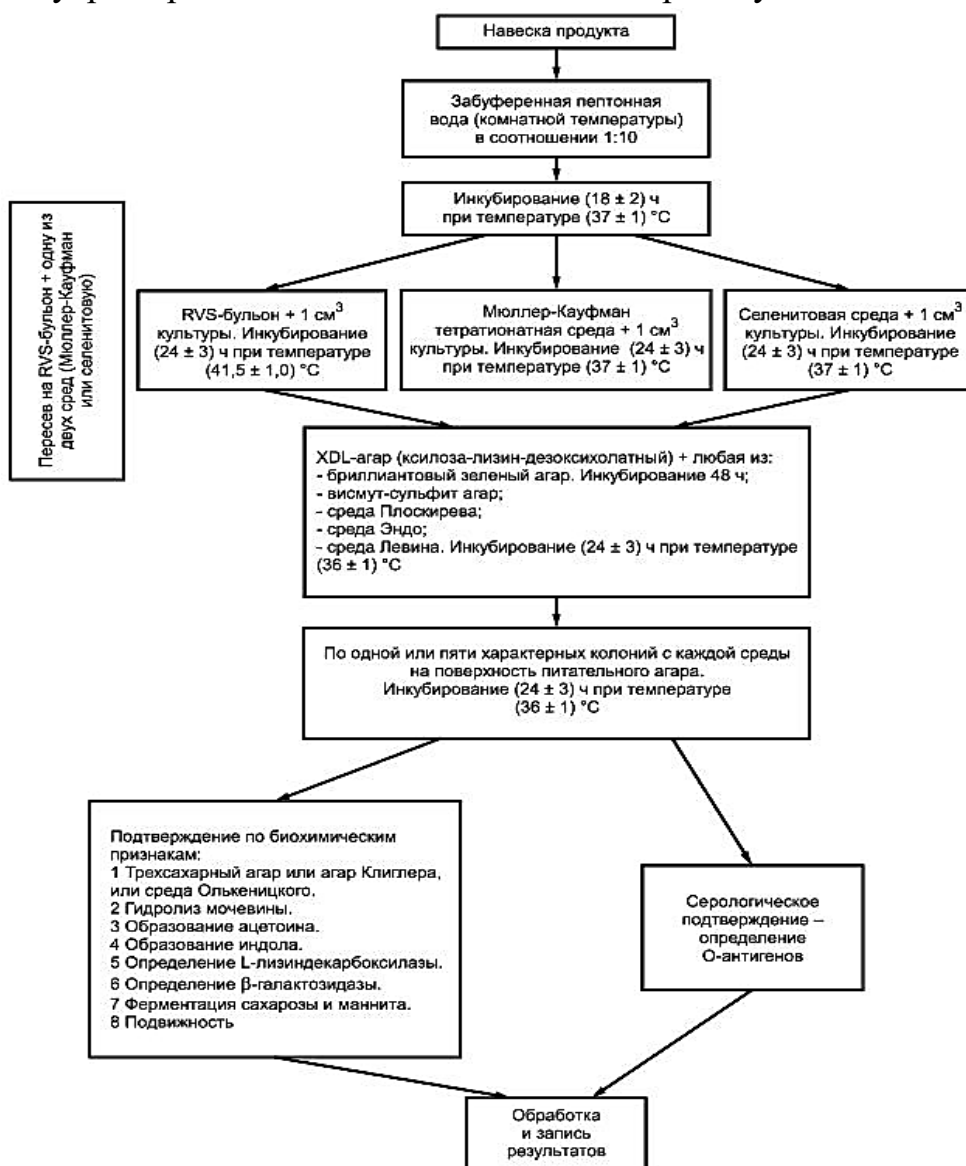


Рис. 6. Схема определения бактерий рода *Salmonella*

Навеска и исходная суспензия

Для приготовления исходной суспензии используют как разбавитель не-селективную среду (забуференную пептонную воду).

Если масса пробы иная, чем 25 г, используют необходимое количество неселективной среды, исходя из соотношения 1:10.

Для уменьшения объема работы, когда испытывают больше одной пробы от определенного продукта и когда очевидно, что объединенная навеска не влияет на результат испытания, – навески объединяют (например, если необходимо исследовать 10 навесок по 25 г, их объединяют и к 250 г добавляют 2,25 дм³ неселективной среды).

Инкубируют исходную суспензию при температуре (37±1) °C в течение (18±2) ч.

Селективное обогащение

Культуры, полученные после инкубирования, пересевают в среды для селективного обогащения. Для этого по 1 см³ культуры пересевают в 10 см RVS-бульона и в 10 см³ селениновой среды или в 10 см³ тетратионатного бульона Мюллер-Кауфмана.

Посевы на RVS-бульоне инкубируют при температуре (41,5±1,0) °C в течение (24±3) ч (следят за тем, чтобы температура не превышала 42,5 °C), а на тетратионатном бульоне и селениновой среде посевы инкубируют при температуре (37±1) °C в течение (24±3) ч.

Если из одного пищевого продукта проведен высев нескольких навесок (каждой отдельно) для выявления бактерий рода *Salmonella*, то допускается из каждого посева пересев проводить в один флакон с каждой селективной питательной средой (RVS-бульоном, тетратионатным бульоном Мюллер-Кауфмана, селениновой средой). При этом количество селективной среды во флаконе должно быть увеличено по сравнению с 10 см³ во столько раз, из скольких посевов проводят пересев.

Свежие продукты, не содержащие поврежденных микроорганизмов, подвергнутые каким-либо воздействиям, например сушке, заморозке и другим, допускается высевать непосредственно в селективные среды, минуя этап неселективного обогащения. Соотношение между количеством высеваемого продукта и средой должно быть не менее 1:10.

Пересев на чашки и идентификация

Культуры через 24 ч инкубирования на селективных средах пересевают по ГОСТ 26670 так, чтобы получить хорошо изолированные колонии, на XLD-агари на одну из агаризованных сред: висмут-сульфит агар, среду Плоскирева, среду Эндо, среду Левина или бриллиантовый зеленый агар.

Чашки переворачивают вверх дном и помещают в термостат при температуре (37±1) °C.

После инкубирования в течение (24 ± 3) ч, а на бриллиантовом зеленом агаре – 48 ч, просматривают чашки и отмечают присутствие типичных колоний бактерий рода *Salmonella* и не совсем типичных колоний, которые могут быть бактериями рода *Salmonella*. Отмечают их местоположение на дне чашки.

Типичные колонии бактерий рода *Salmonella*, вырастающие на XLD-агаре, имеют черный центр и слегка прозрачную зону красноватого цвета, что принадлежит цвету индикатора.

На висмут-сульфит агаре бактерии рода *Salmonella* образуют черные колонии с характерным металлическим блеском, а также зеленоватые темно-зеленым ободком и с пигментированием среды под колониями.

На среде Эндо бактерии рода *Salmonella* образуют круглые бесцветные или слегка розоватые, прозрачные колонии.

На среде Плоскирева бактерии рода *Salmonella* образуют бесцветные прозрачные, но более плотные, чем на среде Эндо, колонии.

На среде Левина бактерии рода *Salmonella* образуют прозрачные, слабо-розовые или розовато-фиолетовые колонии.

На бриллиантовом зеленом агаре бактерии рода *Salmonella* образуют красноватые или розовые, почти белые колонии (их цвет зависит от штамма и срока инкубирования). Лактозоположительные и сахарозоположительные микроорганизмы образуют зеленоватые колонии, окруженные яркой желто-зеленой зоной.

Агар с бриллиантовым зеленым применяют для выделения сальмонелл, кроме *Salmonellatyphi* и *Salmonellaparatyphi*.

Отсутствие в посевах на селективно-диагностических средах типичных или не совсем типичных колоний для бактерий рода *Salmonella*

свидетельствует об отсутствии бактерий рода *Salmonella* в анализируемой навеске (объеме) продукта.

При наличии хотя бы на одной селективно-диагностической среде типичных или не совсем типичных колоний для бактерий рода *Salmonella* проводят их дальнейшую идентификацию.

Идентификация

Переносят отобранные колонии на поверхность предварительно подсушенного питательного агара или мясо-пептонного агара, или ГРМ-агара в чашках Петри или на скошенную поверхность среды в пробирках. Для подтверждения берут полностью изолированные колонии.

Инкубируют инокулированные чашки или пробирки при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 3) ч.

Используют только чистые культуры для биохимической и серологической идентификации.

Окраска по Граму

Из отобранных для биохимической идентификации колоний готовят мазки окрашивают по Граму.

Бактерии рода *Salmonella* являются грамотрицательными палочками с закругленными концами.

Биохимическая идентификация

У отобранных и предварительно пересеянных грамотрицательных культур изучают характер роста на трехсахарном железистом агаре (TSI-агаре) или агаре Клиглера, или среде Олькеницкого, возможность расщепления мочевины, образования ацетона, индола, β -галактозидазы, L-лизиндекарбоксилазы, ферментации сахарозы и маннита, а также подвижность.

Петлей инокулируют специфические среды каждой культурой, полученной из колоний.

1. Засевают штрихом скошенную поверхность агара (среды Олькеницкого) и уколом – столбик. Инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 3) ч.

Интерпретируют изменения в среде следующим образом:

а) столбик агара (среды Олькеницкого)

- желтый – глюкоза положительная (глюкозу ферментирует);

- красный или неизменившийся – глюкоза отрицательная (глюкозу не ферментирует);

- черный – образование сероводорода;

- пузырьки или разрывы – образование газа из глюкозы;

б) скошенная поверхность агара (среды Олькеницкого)

- желтая – лактоза и/или сахароза положительные (лактозу и/или сахарозу ферментирует);

- красная или неизменившаяся – лактоза и сахароза отрицательные (ни лактозу, ни сахарозу не ферментирует).

Агар Клиглера содержит два сахара, поэтому по скошенной поверхности учитывают только ферментацию лактозы.

Типичные культуры бактерий рода *Salmonella* показывают щелочную (красную) поверхность и кислый (желтый) столбик с образованием газа (пузырьков), и примерно в 90% случаев образуется сероводород (черный агар).

Если изолированы лактозоположительные бактерии рода *Salmonella*, то поверхность TSI-агара желтая. Предварительное определение культур бактерий рода *Salmonella* не может основываться только на результатах теста на TSI-агаре.

Дальнейшему изучению подвергают также лактозоположительные бактерии или бактерии, не образующие сероводород, но обязательно ферментирующие глюкозу с образованием или без образования газа.

2. Культуры пересевают штрихом на поверхность агара Кристенсена смочевинной. Посевы инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 3) ч, наблюдая за посевами через определенные промежутки времени.

При положительной реакции – расщеплении мочевины с выделением аммония цвет фенолового красного меняется от розового до светло-вишневого.

Для уреазоположительных бактерий реакция часто становится видимой после 2 ч инкубирования.

Бактерии рода *Salmonella* не расщепляют мочевины.

3. L-лизиндекарбоксилазная среда

Инокулируют снизу жидкую среду. Посевы инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 3) ч.

Помутнение и пурпурный цвет среды после инкубирования указывают на положительную реакцию. Желтый цвет указывает на отрицательную реакцию.

Salmonella paratyphi A не образует L-лизиндекарбоксилазу, остальные образуют.

4. Определение β -галактозидазы

Суспендируют петлей культуру в $0,25\text{ см}^3$ физиологического раствора, прибавляют одну каплю толуола и встряхивают пробирку. Помещают пробирку в водяную баню при температуре 37°C и оставляют примерно на 5 мин. Затем добавляют $0,25\text{ см}^3$ реактива для определения β -галактозидазы и перемешивают.

Оставляют пробирку в водяной бане при температуре 37°C в течение (24 ± 3) ч, наблюдая за изменением цвета через определенные промежутки времени.

Желтый цвет указывает на положительную реакцию. Изменение цвета обнаруживается примерно через 20 минут.

Бактерии рода *Salmonella*, кроме *S. arizonae*, не обладают β -галактозидазой.

Для определения β -галактозидазной активности допускается использование ONPG-дисков. Для этого испытуемые культуры высевают на среду, содержащую лактозу в концентрации 0,1%, или агар Клиглера, или трехсахарный агар, или агар Олькеницкого. Посевы инкубируют в течение (18 ± 2) ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Петлей отбирают выросшую культуру и готовят из нее густую суспензию в $0,5\text{ см}^3$ стерильной дистиллированной воды. К полученной суспензии добавляют один ONPG-диск и помещают в водяную баню при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Желтое окрашивание, появившееся через 15-20 мин, указывает на положительную реакцию. Для окончательного учета отрицательного результата посевы продолжают инкубировать в течение 2, 4 и 24 ч.

5. Определение образования ацетона (реакция Фогес-Проскауера)

Суспендируют петлей испытуемую культуру в стерильной пробирке, содержащей 3 см³ VP среды или мясо-пептонного бульона с глюкозой.

Посевы инкубируют при температуре (37±1) °С в течение (24±3) ч.

После инкубации прибавляют две капли раствора креатина, три капли спиртового раствора α-нафтола и две капли раствора гидроокиси калия, перемешивают содержимое пробирки после прибавления каждого реактива.

Появление через 15 мин от розового до светло-красного окрашивания указывает на положительную реакцию.

Бактерии рода *Salmonella* не образуют ацетона (реакция Фогес-Проскауера отрицательная).

Допускается определение ацетона проводить без применения раствора креатина. Для этого после инкубирования к 1 см³ отобранной культуральной жидкости прибавляют 0,6 см раствора α-нафтола и 0,2 см³ раствора гидроокиси калия. После прибавления каждого реактива пробирку встряхивают. Появление розового окрашивания через 15 мин указывает на положительную реакцию.

6. Определение образования индола

Культуры пересевают в пробирку, содержащую 5 см³ триптон/триптофановой среды, или в бульон Хоттингера, или в мясо-пептонный бульон с L-триптофаном. Посевы инкубируют при температуре (37±1) °С в течение (24±3) ч.

После инкубирования к посевам прибавляют по каплям 1 см³ реактива Эрлиха или Ковача, содержимое пробирки перемешивают.

Образование красного кольца указывает на положительную реакцию. Желто-коричневое кольцо указывает на отрицательную реакцию.

Бактерии рода *Salmonella* не образуют индол.

7. Определение ферментации маннита и сахарозы

Культуры пересевают в среды Гисса с маннитом или сахарозой. Посевы инкубируют при температуре (37±1) °С в течение (24±3) ч.

Бактерии рода *Salmonella* не ферментируют сахарозу, но ферментируют маннит. При сбраживании маннита цвет среды изменяется, образуется или не образуется газ.

8. Определение подвижности

Культуры пересевают уколом в полужидкий питательный агар или полужидкий мясо-пептонный агар.

Посевы инкубируют при температуре (37±1) °С в течение (24±3) ч.

При росте подвижных культур отмечается диффузионный рост повсюду столбику агара, при росте неподвижных культур – вокруг места укола.

Бактерии рода *Salmonella* подвижны, кроме *S. gallinarum* и *S. pullorum*.

Серологическая идентификация

Определение присутствия соматического О-антигена, антигена вирулентности Vi-, жгутикового H-антигена в изолированных колониях проводят с помощью реакции агглютинации на предметном стекле с соответствующими сыворотками после исключения самоагглютинирующих штаммов. Сыворотки используют в соответствии с инструкцией изготовителя, если есть отличие от описания, приведенного ниже.

Серологическую идентификацию для подтверждения принадлежности к бактериям рода *Salmonella* проводят с культурами, предварительно пересеянными на поверхность мясо-пептонного агара или ГРМ-агара.

Исключение самоагглютинирующих штаммов

Помещают каплю физиологического раствора на тщательно очищенное предметное стекло. Диспергируют в этой капле часть тестируемой колонии так, чтобы получилась гомогенная и густая суспензия.

Допускается размешивание части колонии в капле воды и перемешивание этого раствора с одной каплей физиологического раствора.

Покачивают осторожно стекло в течение 30-60 с. Отмечают результаты на темном фоне, лучше с помощью увеличительного стекла. Если наблюдается в разной степени склеивание бактерий, то есть образование осадка, то считают, что тестируемые штаммы обладают самоагглютинацией.

Штаммы бактерий, обладающие самоагглютинацией, не подвергают дальнейшей серологической идентификации.

Определение наличия О-антигенов

Штаммы, у которых не выявлено самоагглютинации, испытывают в реакции агглютинации с агглютинирующими адсорбированными поливалентными сальмонеллезными О-сыворотками основных групп А, В, С, D, Е, а затем, если не выявлено О-антигенов с сыворотками основных групп, ставят реакцию с сыворотками редких групп.

Подготовка сывороток к постановке реакции агглютинации и методика ее проведения указаны в инструкции, прилагаемой к сывороткам.

Агглютинация (наличие О-антигенов) проявляется в виде склеивания бактериальной массы и полного или частичного просветления жидкости.

При отрицательной реакции агглютинации культура после тщательного смешивания с каплей сыворотки образует гомогенную смесь.

Используют поли- и моновалентные сыворотки, одну после другой.

Определение Vi- и H-антигенов

Наличие Vi- и H-антигенов определяют при необходимости по санитарно-эпидемиологическим показаниям.

Перед выявлением H-антигенов испытуемой культурой инокулируют полужидкий агар. Посевы инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 2) ч. Полученную культуру используют для выявления H-антигенов.

Выявление и определение патогенных листерий

Листерии – короткие палочки правильной формы, $0,4-0,5 \times 0,5-2,0$ мкм, с закругленными концами, иногда почти кокки, одиночные или в коротких цепочках, реже в длинных нитях. Грамположительные; спор и капсул не образуют; некислотоустойчивые. Факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы; метаболизм бродильного типа. Каталазоположительные; оксидазоотрицательные. Подавляющее число изолятов патогенных листерий идентифицированы как *Listeriamonocytogenes*. Этот возбудитель относится к III группе патогенных бактерий и представляет опасность для здоровья человека. Определение патогенных листерий проводят согласно ГОСТ 32031-2012 Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeriamonocytogenes*.

Анализируемую пробу X (г или см³) вносят в селективную средупервичного обогащения (Бульон Фразера полуконцентрированный, селективный накопительный бульон UVM, питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ I)), исходя из соотношения продукта и среды 1:9.

Первичное обогащение

Исходную суспензию культивируют при температуре (30 ± 1) °C в течение (24 ± 3) ч.

Вторичное обогащение

Посевной материал в объеме 0,1 см³, пересевают в пробирку, содержащую 10 см³ среды обогащения (Бульон Фразера, селективный накопительный бульон (UVM II), питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ II)).

Посевы культивируют в течение (48 ± 2) ч при температуре (37 ± 1) °C.

Пересев на плотные селективные среды

Из пробирок с посевами после культивирования с помощью петли или шпателя проводят пересев на поверхность первой плотной селективной среды (Агар *Listeria* по Оттавиани и Агости (ALOA)) так, чтобы получить хорошо изолированные колонии.

Аналогичным образом проводят пересев и на вторую плотную селективную среду (Бриллианс *Listeria* агар (BRILLIANCE *LISTERIA* agar), Оксфорд агар, Палкам агар).

Чашки с посевами на первой плотной селективной среде культивируют вверх дном в термостате при температуре (37 ± 1) °C в течение 24-48 ч.

Чашки с посевами на второй плотной селективной среде инкубируют согласно инструкции производителя питательных сред.

Через (24 ± 3) ч или (48 ± 2) ч (если после (24 ± 3) ч отмечен слабый рост культуры или его отсутствие) культивирования на первой и второй плотной селективной средах учитывают наличие колоний с ростом характерных для бактерий рода *Listeria* и *Listeriamonocytogenes*.

На первой селективной плотной среде бактерии вида *L.monocytogenes* и *L. ivanovii* растут в виде сине-зеленых колоний, окруженных непрозрачным ореолом (типичные колонии). Другие виды бактерий рода *Listeria* также растут в виде сине-зеленых колоний, без ореола.

Посевы на второй плотной селективной среде просматривают на наличие колоний с ростом характерным для бактерий рода *Listeria*.

На Палкам агаре все виды бактерий рода *Listeria* формируют мелкие серовато-зеленые или оливково-зеленые колонии с черным ореолом, иногда с черным центром.

На Оксфорд агаре все виды бактерий рода *Listeria* формируют мелкие сероватые колонии, окруженные черным ореолом. На ПАЛ все виды бактерий рода *Listeria* формируют мелкие серовато-желтые колонии с черным ореолом.

При отсутствии роста характерных колоний бактерий рода *Listeria* и *Listeria monocytogenes* на первой и второй плотных селективных средах исследования прекращают и делают заключение об отсутствии в исследуемой пробе продукта бактерий *Listeria monocytogenes*.

Идентификация выделенных культур до рода Listeria

С каждой чашки с плотной селективной средой отбирают по пять колоний с ростом, характерным для бактерий рода *Listeria* и *Listeria monocytogenes*.

Если на чашке выросло менее пяти типичных колоний, отбирают их все.

Отобранные колонии пересевают на поверхность подсушенного триптон-соевого агара с дрожжевым экстрактом или другого плотного питательного агара так, чтобы получить изолированные колонии.

Посевы культивируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 3) ч до появления видимого роста.

На триптон-соевом агаре с дрожжевым экстрактом бактерии рода *Listeria* растут в виде выпуклых, бесцветных и непрозрачных колоний в диаметре от 1,0 до 2,0 мм.

Для подтверждения принадлежности выделенной культуры к бактериям рода *Listeria* проводят следующие тесты.

Реакция на каталазу

Берут изолированную колонию, выделенную, и вносят в каплю 3%-ного раствора перекиси водорода. Мгновенное образование пузырьков газа указывает на положительную реакцию.

Бактерии рода *Listeria* являются каталазоположительными.

Окраска по Граму

Бактерии рода *Listeria* являются грамположительными тонкими, короткими палочками.

Определение подвижности

Культуры пересевают в триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом или в другую жидкую питательную среду.

Посевы культивируют при температуре $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ от 8 до 24 ч до появления мутности в бульоне. Затем каплю культуральной жидкости помещают на предметное стекло и накрывают сверху покровным стеклом и микроскопируют.

В поле зрения микроскопа должны наблюдаться короткие палочки со скользящими движениями.

При культивировании посевов в жидкой питательной среде при температуре выше $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ подвижность бактерий не наблюдается.

Идентификация бактерий рода Listeria до вида

Культуры идентифицируют следующими методами.

Определение бета-гемолитической активности с использованием кровяного агара

Поверхность кровяного агара перед использованием необходимо тщательно подсушить. Чашку с тыльной стороны целесообразно разделить на квадраты и проколоть каждый маркированный квадрат бактериальной иглой с колонией культуры отобранной с триптон-соевого агара с дрожжевым экстрактом. На каждую чашку с кровяным агаром, кроме исследуемых культур, должны быть посеяны контрольные штаммы, такие как *L. monocytogenes* (положительный контроль) и *L. innocua* (отрицательный контроль).

Посевы культивируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 2) ч.

Зона – гемолиза на кровяном агаре у культуры *L. monocytogenes* – в виде узкой, чистой, светлой зоны; *L. innocua* – нет зоны гемолиза вокруг укола; *L. seeligeri* – слабая зона гемолиза; *L. ivanovii* – широкая, четко обозначенная зона гемолиза.

После инкубирования проводят визуальное сравнение прозрачности зон вокруг анализируемых и контрольных культур.

С использованием суспензии эритроцитов барана

В 0,15 см триптон-соевого бульона с дрожжевым экстрактом необходимо внести одну колонию культуры.

Посевы культивируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. Затем добавляют 0,15 см³ суспензии эритроцитов барана и продолжают культивирование при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ от 15 до 60 мин, с последующим охлаждением при температуре $(3 \pm 2)^\circ\text{C}$ около 2 ч.

При наличии у культуры гемолитической активности – жидкость окрашена в соломенно-коричневый цвет и отсутствует осадок красных кровяных клеток на дне лунки.

При отсутствии гемолитической активности наблюдается осадок красных кровяных клеток на дне лунки. Клетки могут быть красно-коричневыми по цвету.

Если реакция неопределенная, следует оставить культуру при температуре (3 ± 2) °C на 24 ч.

Определение лецитиназной активности

Поверхность лецитин-агара с активированным углем и без угля перед использованием необходимо тщательно подсушить. Чашку стильной стороны целесообразно разделить на квадраты и высевать на каждый маркированный квадрат бактериальной петлей колонию культуры отобранной с триптон-соевого агара с дрожжевым экстрактом.

На каждую чашку с лецитин-агаром с активированным углем и без угля, кроме исследуемых культур, должен быть посеян контрольный штамм *L.monocytogenes* (положительный контроль).

Посевы культивируют при температуре (37 ± 1) °C в течение (48 ± 2) ч.

Культура *L. monocytogenes* дает плотную зону помутнения шириной 3,0-6,0мм на лецитин-агаре с активированным углем за счет гидролиза лецитина.

Культура *L. monocytogenes* не дает плотную зону помутнения на лецитин-агаре без активированного угля.

Определение ферментативных свойств L. monocytogenes

У культуропределяют ферментативные свойства. Для этого используют суточную культуру.

Посевы следует культивировать при температуре (37 ± 1) °C в течение пяти суток.

Положительную реакцию в отношении углеводов определяют по изменению окраски среды в желтый цвет за счет образования кислоты.

Изменение цвета среды происходит, как правило, в течение 24-48 ч.

Выявление и определение галофильных вибрионов

Типичными представителями галофильных вибрионов являются *Vibrioparahaemolyticus*, вызывающие острые гастроэнтериты. По клиническому течению они напоминают дизентерийные заболевания, которые занимают первое место среди пищевых бактериальных отравлений. Их вспышки связаны исключительно с употреблением моллюсков или сырой рыбы. *Vibrioparahaemolyticus* – мезофильные грамотрицательные, прямые или слегка изогнутые подвижные палочки с одним полярным жгутиком, факультативные анаэробы, не образующие спор, активно подвижны, содержат цитохромоксидазу, не расщепляют лактозы и сахарозы, растут на питательных средах с содержанием хлорида натрия от 3 до 8 %, декарбоксилируют лизин, образуют индол, ферментируют (без газообразования) арабинозу, глюкозу, мальтозу, не образуют ацетил-метилкарбинол. Весьма чувствительны к понижению и повышению температуры, низкому значению pH среды. При охлаждении до 0 °C и замораживании в чистой культуре они быстро погибают, но в рыбе даже при низ-

кой температуре остаются жизнеспособными. Галофильные вибрионы хорошо растут на обычных питательных средах, содержащих 2-3 % NaCl. Оптимальная температура роста 30...37 °C, оптимальный pH 7,5-8,8. Определение *Vibrioparahaemolyticus* проводят согласно Инструкции по санитарно-микробиологическому контролю производства пищевой продукции из рыбы и морских беспозвоночных №5319-91.

Проведение исследований

Метод определения *Vibrioparahaemolyticus* основан на выявлении типичных колоний на дифференциально-диагностических средах определенного состава и установлении принадлежности бактерий к парегемолитическим вибрионам по морфологическим и биохимическим свойствам. Для определения количества парегемолитических вибрионов в 1 г продукта делают высеив из разведений. Для приготовления разведений из усредненной пробы отбирают навеску массой 25 г и растирают с кварцевым песком в стерильной ступке или гомогенизируют в измельчителе тканей. Добавляют 225 см³ 0,1 % й пептонной воды с 3 % хлорида натрия (разведение 10⁻¹), размешивают, отстаивают в течение 5 мин, из надосадочной жидкости готовят последующие разведения.

Чтобы получить 0,1 г продукта производят посев из разведения 10⁻¹ по 0,2 см³ надосадочной жидкости на пять чашек с плотной средой дифференциально-диагностическим агаром (ДДА). Из разведения 10⁻² параллельно высеивают по 0,1 см³ на две чашки, что соответствует посеву по 0,001 г продукта на одной чашке. При необходимости засевают последующие разведения. Посевы инкубируют при температуре 37 °C в течение 24 ч. Производят подсчет типичных колоний. На ДДА вибрионы образуют плосковыпуклые полупрозрачные колонии круглой формы с ровными краями диаметром от 1 до 5 мм, с влажной гладкой блестящей поверхностью голубовато-зеленого цвета (рис. 8).

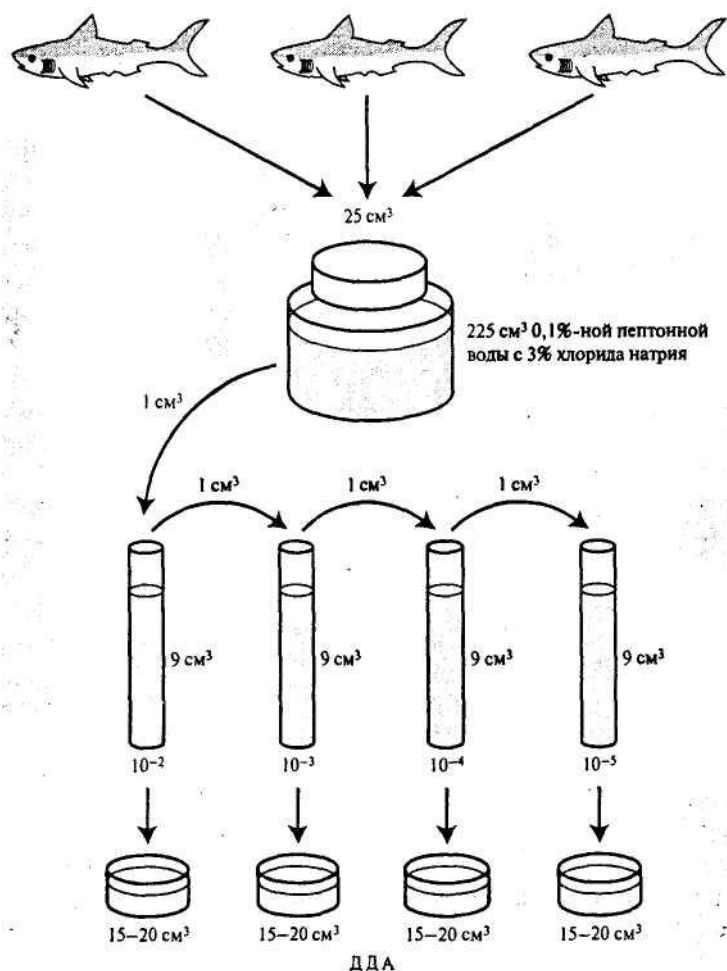


Рис. 8. Схема определения галофильных вибрионов

Результаты роста на ДДА оценивают следующим образом: отсутствие роста параземолитических вибрионов на всех пяти чашках посева из разведения 10^{-1} означает, что в 1 г продукта параземолитические вибрионы отсутствуют или содержатся в количестве менее 10 клеток.

Обнаружение роста 10-50 типичных колоний на пяти чашках с посевом из разведения 10^{-1} при отсутствии роста на двух чашках с посевом из разведения 10^{-2} указывает, что в 1 г продукта содержится от 100 до 500 жизнеспособных клеток параземолитических вибрионов. Для выявления присутствия параземолитических вибрионов в 25 г продукта 25 г подготовленной пробы переносят в 100 см³ жидкой среды обогащения. Посевы помещают в термостат при 37 °С, через 18-24 ч производят пересев на плотный ДДА. Чашки инкубируют при 37 °С в течение 24 ч. Выявляют типичные колонии параземолитических вибрионов. Для подтверждения принадлежности выделенных на дифференциально-диагностических средах микроорганизмов к параземолитическим вибрионам проводят изучение их морфологических свойств и ставят биохимические тесты.

Для идентификации бактерий делают пересев с ДДА в 1 % пептонную воду с 3 % хлорида натрия (о наличии роста в пептонной воде свидетельствует помутнение с образованием нежной голубой пленки) и на ДДА. Из выросших

на ДДА колоний готовят мазки, окрашивают по Граму и изучают морфологию клеток. Подвижность определяют микроскопированием фазово-контрастным методом в раздавленной капле или при посеве уколом в полужидкий агар (0,25 % агара), содержащий 3 % хлорида натрия. Засевают односуточную бульонную культуру и инкубируют ее при температуре 37 °С в течение 24 ч. Подвижные формы вызывают диффузное помутнение, слабоподвижные – вырастают по ходу укола.

Декарбоксилазную активность определяют в среде ДАГВ с лизином. Для этого в две пробирки с ДАГВ (1-я пробирка с амино-, кислотой лизином и 2-я – контрольная) засевают по 0,1-0,2 см³ односуточной культуры или по две петли агаровой культуры. После посева в каждую пробирку добавляют по 0,5 см³ стерильного вазелинового масла, помещают в термостат при температуре 37 °С и наблюдают. Обычно реакция наблюдается через 24 ч. При отрицательной реакции происходит только окисление глюкозы, среда становится желтой. Если микроорганизмы вырабатывают декарбоксилазу, то после окисления глюкозы происходит подщелачивание среды, и она становится темно-фиолетовой. Парагемолитические вибрионы дают в тесте на лизин декарбоксилазную положительную реакцию. Образование декарбоксилазы является отличительным признаком от образующих газ представителей рода *Aeromonas*, к которому относятся и галофильные вибрионы.

Определение образования индола

При росте парагемолитических вибрионов образуется индол.

Для определения цитохромоксидазы односуточную культуру засевают на поверхность щелочного агара (рН 8), содержащего 3 % хлорида натрия и термостатируют при температуре 37 °С в течение 18 ч. Затем наносят на выросшую в чашке культуру одну каплю реактива для определения цитохромоксидазы или делают штрих из колонии на фильтровальную бумагу, смоченную этим реактивом. Если оксидазный тест положителен, через 1-3 мин наблюдается окрашивание в ярко-синий цвет. Наличие цитохромоксидазы позволяет отличить *Vibrioparahaemolyticus* от бактерий семейства кишечных палочек, которые не обладают оксидазной активностью.

Способность ферментировать лактозу и сахарозу определяют путем посева культуры на скошенный агар, содержащий 3 % хлорида натрия, лактозу, сахарозу и индикатор (можно использовать среды Клиглера, Ресселя), штрихом по поверхности и уколом в столбик среды. Инкубируют при температуре 37 °С в течение 18 ч. Парагемолитические вибрионы цвета среды не изменяют, газа не образуют (не расщепляют лактозу и сахарозу).

Для определения галофильных свойств исследуемую культуру засевают в 5 см³ 1 %-й пептонной воды (рН 7,8) без хлорида натрия и с 3, 8, 10 % хлорида натрия. Посевы термостатируют при температуре 37 °С в течение 24 ч. Парагемолитические вибрионы активно развиваются в средах, содержащих 3

и 8 % хлорида натрия и не дают роста в средах, не содержащих хлорида натрия и содержащих 10 % и более.

Способность к образованию ацетилметилкарбинола определяют методом, описанным выше. Парагемолитические вибрионы не образуют ацетилметилкарбинола. Для определения интенсивности кислотообразования (реакция Кларка) засевают исследуемую культуру в среду Кларка с 3 % хлорида натрия, термостатируют при температуре 37 °С в течение 24-48 ч. При наличии роста добавляют 2-3 капли 0,04 %-го раствора метилового красного (0,04 г метилового красного растворяют в 40 см³ этилового спирта и 60 см³ дистиллированной воды), встряхивают и помещают в термостат на 1 ч. При сильном кислотообразовании среда окрашивается в красный цвет, при слабом – в желтый. Парагемолитические вибрионы дают положительную реакцию в 84 % случаев.

Для определения ферментативной активности односуточную культуру засевают на среды Гисса с 1 % углеводов и 3 % NaCl (пестрый ряд), инкубируют при температуре 37 °С в течение 18-24 ч. В результате расщепления углеводов с образованием кислых продуктов распада цвет среды изменяется при образовании газа, который собирается в поплавке. Парагемолитические вибрионы ферментируют без образования газа глюкозу, мальтозу, арабинозу.

Для вибрионов характерно расщепление глюкозы с образованием кислоты без газа как в анаэробных (в высоком столбике), так и в аэробных условиях на среде Хью-Лейфсона в пробирках. Определение типа расщепления глюкозы позволяет отличать вибрионы от сходных с ними по морфологии представителей рода *Pseudomonas* и *Lomonomonus*.

Для идентификации вибрионов можно использовать системы индикаторные бумажные (СИБ).

Выявление и определение бактерий рода Enterococcus

К группе *Enterococcus* относятся организмы, образующие клетки сферические или лишь слегка овальные и почти всегда четко грамположительные, в парах или коротких цепочках в жидкой среде. Эндоспор не образуют. Подвижность не типична. Факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы. Метаболизм бродильного типа. Сбраживают разнообразные углеводы с образованием в основном молочной кислоты, но не газа, снижая pH до 4,2-4,6. Каталазоотрицательные. Определение энтерококков проводят согласно ГОСТ 28566-90 «Метод выявления и определения количества энтерококков».

Проведение испытания

Из навески продукта готовят исходное и ряд десятикратных разведений так, чтобы можно было определить минимальное количество продукта, содержащего энтерококки, или высевает навеску исследуемого продукта, которая

указана в нормативно-технической документации на этот продукт. Если необходимо выявить энтерококки в навеске продукта определенной массы или определенного объема, то навеску продукта или его разведение высевают в жидкую питательную среду (азидно-глюкозный бульон или щелочная полимиксиновая среда). Посевы инкубируют при $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24-48 ч, через 24 ч проводят предварительный учет результатов, через 48 ч – окончательный.

После инкубирования посевов на жидких средах учитывают пробирки с признаками роста микроорганизмов (помутнение среды и изменение ее окраски до желтой). Из пробирок с признаками роста производят пересев на поверхность агаризованной молочно-ингибиторной среды с теллуридом калия таким образом, чтобы получить рост изолированных колоний. Посевы инкубируют при $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24-48 ч. После инкубирования посевов на агаризованных средах учитывают чашки Петри, на которых выросло от 15 до 150 характерных для энтерококков колоний окрашенных в черный цвет (рис. 9). После 24-48 ч инкубирования посевы просматривают и отмечают рост колоний, характерных для энтерококков.

Для дальнейшего подтверждения принадлежности характерных колоний к энтерококкам отбирают не менее пяти колоний и пересевают их на чашки Петри с агаризованной средой (глюкозо-триптонный агар с дрожжевым экстрактом) таким образом, чтобы получить рост изолированных колоний. Посевы инкубируют при $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24-48 ч.

Подтверждение принадлежности характерных колоний к энтерококкам

Из колоний, выросших на глюкозо-триптонном агаре с дрожжевым экстрактом, готовят препараты и окрашивают их по Граму. Энтерококки – грамположительные кокки, расположенные парами, короткими или длинными цепочками. У колоний определяют наличие каталазы. Энтерококки каталазы не образуют. При более углубленном анализе и в целях эпидемиологической безопасности проводят дальнейшее подтверждение принадлежности характерных колоний к энтерококкам.

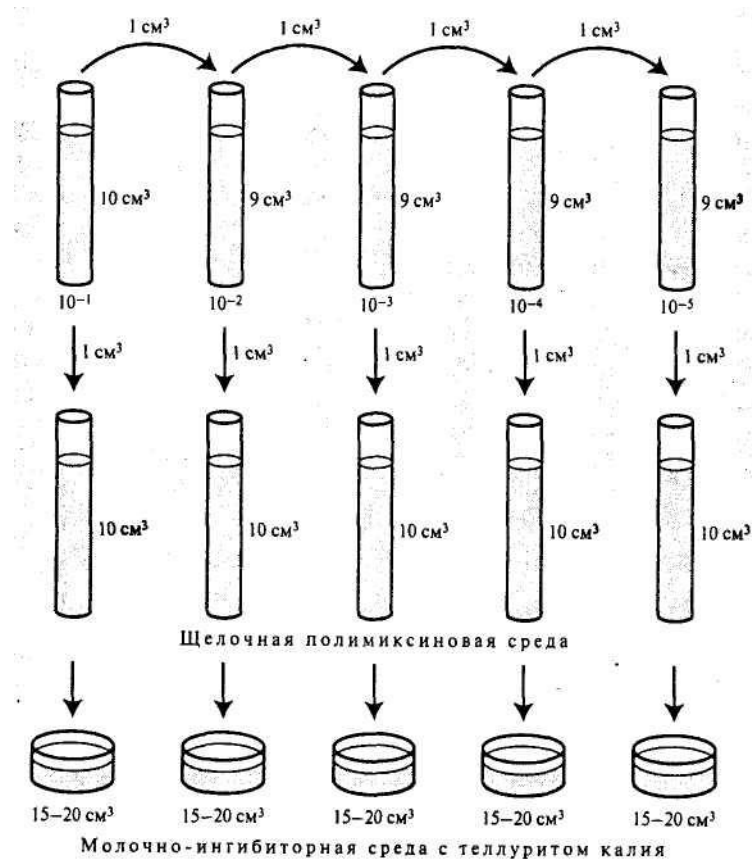


Рис. 9. Схема определения бактерий рода *Enterococcus*

Для определения возможности роста бактерий при температуре $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ культуры высевают в глюкозо-триптонный бульон с дрожжевым экстрактом с рН $(7,2 \pm 0,1)$. Посевы инкубируют при $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48-72 ч. Энтерококки растут в данном температурном режиме, вызывая помутнение среды.

Для определения возможности роста энтерококков в среде с массовой концентрацией NaCl 65 г/дм^3 культуры высевают в солевой бульон и инкубируют при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24-48 ч. Энтерококки вызывают помутнение среды и выпадение осадка.

Для определения возможности роста в щелочной питательной среде исследуемые культуры высевают в глюкозо-триптонный бульон с дрожжевым экстрактом и рН 9,6 и инкубируют в течение 24-48 ч при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Энтерококки растут в щелочной среде, вызывая ее помутнение.

Для постановки теста на терморезистентность культуры высевают в глюкозо-триптонный бульон с дрожжевым экстрактом с рН $(7,2 \pm 0,1)$ пробирки выдерживают при $(60 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 30 мин и инкубируют 24-48 ч при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Энтерококки вызывают помутнение среды.

Для определения возможности роста в среде с 40 % желчи исследуемые культуры высевают в 40 %-й желчный бульон и инкубируют в течение 24-48 ч при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Энтерококки растут в средах с 40 %-м содержанием желчи, вызывают ее помутнение.

Обработка результатов

Результаты каждой пробы оценивают отдельно. Если при изучении культуральных и морфологических свойств микроорганизмов обнаружены грамположительные, не образующие каталазы кокки, то это свидетельствует о принадлежности их к энтерококкам. Если при исследовании колоний в 80 % случаев, [т. е.] не менее чем в четырех из пяти колоний, подтвержден рост энтерококков, считают, что все колонии, выросшие на чашке Петри, принадлежат к энтерококкам. В остальных случаях количество энтерококков определяют исходя из процентного отношения подтвержденных колоний к общему количеству колоний, взятых для подтверждения.

При посеве навески продукта или разведения продукта на жидкие среды, посеvy считают положительными, если при последующем пересеве на агаризованные среды и подтверждении характерных колоний хотя бы в одной характерной колонии обнаружены энтерококки. Результаты определения количества энтерококков пересчитывают на 1 г/см^3 продукта и записывают в соответствии с требованиями ГОСТ 26670-91. Результаты выявления энтерококков в определенной навеске записывают следующим образом: энтерококки обнаружены или не обнаружены (при этом указывается навеска продукта).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

Тема: Санитарно-микробиологический контроль рыбы-сырца, охлажденной и мороженой рыбы

Цель занятия: Ознакомиться с методами отбора проб, подготовки их к анализу и определением количества МАФАнМ и бактерий группы кишечных палочек (коли-формы) в рыбы-сырце, охлажденной и мороженой рыбе.

Санитарно-микробиологический контроль рыбы-сырца, охлажденной и мороженой рыбы включает определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, наличия бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий), *St. aureus*, патогенных, в том числе *Salmonella*.

Нормативы рыбы-сырца, охлажденной и мороженой рыбы представлены в таблице 1.

Таблица 1

Микробиологический контроль рыбы-сырца						
Объект контроля	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускается				Примечание
		БГКП (коли-формы)	<i>St. aureus</i>	патогенные, в том числе сальмонеллы и <i>L. monocytogenes</i>		
Рыба-сырец и рыбы свежая	$5 \cdot 10^4$	0,01	0,01	25		<i>V. parahaemolyticus</i> – не более 100 КОЕ/г, для морской рыбы
Микробиологический контроль морских беспозвоночных						
Объект контроля	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускается				Примечание
		БГКП (коли-формы)	<i>St. aureus</i>	сульфит-редуцирующие клостридии	патогенные, в том числе сальмонеллы и <i>L. monocytogenes</i>	
Живые	$5 \cdot 10^3$	0,01	0,01	-	25	<i>V. parahaemolyticus</i> – в 25 г не допускаются для морских
Охлажденные, мороженые	$1 \cdot 10^5$	0,001	0,01	-	25	То же

Задание 1. Отобрать пробы, подготовить их к анализу, произвести быст-

рую санитарную оценку рыбы-сырца и/или охлажденной рыбы методом бактериоскопии с помощью мазков-отпечатков.

Оборудование и материалы:

исследуемое сырье (целая рыба), стерильные предметные стекла, металлические лопаточки, спирт в склянке с притертой пробкой, скальпель, пинцет, красители для окраски по методу Грама.

Содержание работы:

1. Познакомиться с методами отбора проб и подготовки их к анализу.
2. Приготовить 2 мазка-отпечатка (с поверхности и мышц рыбы).
3. Высушить, зафиксировать и окрасить по Граму приготовленные мазки-отпечатки.
4. Промикроскопировать мазки-отпечатки с иммерсионным объективом, отмечая наличие и количество палочек, кокков и следов распада мышечной ткани.
5. Сделать заключение о доброкачественности (сортности) рыбы.

Таблица 2

Микробиологический контроль мидий, устриц, гребешков						
Объект контроля	КМА-ФАНМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускается				Примечание
		БГКП (коли-формы)	<i>St. aureus</i>	Сульфит-редуцирующие клостридии	патогенные, в том числе сальмонеллы и <i>L. monocytogenes</i>	
Двустворчатые моллюски (мидии, устрицы, гребешок и другие)						
- живые	$5 \cdot 10^3$	1,0	0,1	01	25	<i>E.coli</i> – в 1 г не допускаются; <i>Enterococcus</i> – в 0,1 г не допускаются; <i>V. parahaemolyticus</i> – в 25 г не допускаются для морских
-охлажденные, -мороженные	$5 \cdot 10^4$	0,1	0,1	-	25	<i>V. parahaemolyticus</i> – не более 100 КОЕ/г, для морской рыбы
- головные моллюски	$1 \cdot 10^5$	0,001	0,01	-	25	То же
Микробиологический контроль охлажденной и мороженой рыбы						

Объект контроля	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускается			Примечание
		БГКП (коли-формы)	<i>St. aureus</i>	патогенные, в том числе сальмонеллы и <i>L. monocytogenes</i>	
Рыба охлажденная, мороженая	$1 \cdot 10^5$	0,001	0,01	25	<i>V. parahaemolyticus</i> – не более 100 КОЕ/г, для морской рыбы

Техника выполнения работы

1. Отбор проб и подготовка их к анализу

Отбор проб и подготовка их к анализу проводятся с соблюдением условий асептики, исключающих возможность попадания микроорганизмов из внешней среды.

2. Получение мазков-отпечатков с поверхности рыбы и ее мышц.

Отпечатки с поверхности тела рыбы делается путем прикладывания стерильного предметного стекла к выбранному для исследований участку (в приголовной части). Взятие отпечатков из толщи мышц производится следующим образом: кожу посередине спины или ближе к голове освобождают от чешуи и прижигают двумя заранее прокаленными на спиртовке в течение не менее 10 минут металлическими лопаточками. Затем стерильным скальпелем вырезают кусочки мяса площадью $1,5 \text{ см}^2$ и толщиной 1-2 см. Этим кусочком мяса делают отпечаток на стерильном предметном стекле. Мазки подсушивают, фиксируют, окрашивают по Граму и просматривают под микроскопом. В поле зрения микроскопа в отпечатках-мазках с поверхности свежей, только что выловленной, рыбы могут содержаться единичные клетки (палочки и кокки), в толще мяса микроорганизмы должны отсутствовать. В мазках с поверхности задержанной, но пригодной для пищевого использования рыбы (II сорта), содержится 10-30 клеток, а в толще мяса – единичные клетки (кокки). В мазках-отпечатках с мышц рыбы задержанной (несортной пищевой) наряду с кокками присутствуют единичные палочки.

Задание 2. Определить количество МАФАнМ рыбы методом смыва микроорганизмов с ее поверхности.

Оборудование и материалы:

исследуемое сырье (мелкая рыба или куски крупной рыбы), колбы конические на 250 см^3 со 150 см^3 стерильной водопроводной водой или физиологического раствора (0,5 % поваренной соли в дистиллированной воде), пробирки с 9 см^3 стерильной воды, весы (на 0,5 кг), скальпель, склянка со спиртом, стерильные пипетки на $1-2 \text{ см}^3$, стерильные чашки Петри, пробирки с

расплавленным и охлажденным агаром.

Содержание работы:

Первое занятие:

1. Ознакомиться с методами отбора проб и подготовкой их к анализу.
2. Произвести смыв микробов стерильной водой с поверхности исследуемой рыбы.
3. Сделать необходимые разведения смывной воды.
4. Произвести посев в пустые стерильные чашки Петри.
5. Залить чашки Петри расплавленным и охлажденным МПА (мясопептонным агаром).
6. Поместить посевы в термостат.

Второе занятие:

7. «Прочитать» (просмотреть) посевы, подсчитав количество выросших микробов.
8. Рассчитать количество МАФАНМ рыбы и сделать заключение о санитарном состоянии рыбы.

Техника выполнения работы

1. Отбор проб и подготовка их к анализу

Отбор проб и подготовка их к анализу проводятся с соблюдением условий асептики.

Мелкую рыбу и мелкие нерыбные объекты морского промысла от 3 до 10 шт. (15 г) отбирают целиком из различных мест обследуемой партии во взвешенную стерильную колбу (или банку).

Колбу с образцами взвешивают и по разности весов устанавливают массу отобранной пробы. Затем в колбу наливают воды столько, чтобы она полностью покрывала пробу (135 см³).

При небольшой массе пробы стерильную пептонную воду удобно наливать в количестве, в 9 раз превышающем массу рыбы, чтобы получить сразу исходное разведение 1:10. Колбу тщательно встряхивают в течение 5 мин, дают отстояться 3 мин и приступают к анализу.

2. Определение КМАФАНМ.

При определении КМАФАНМ время между отбором проб и проведением анализа должно быть максимально сокращено.

Из подготовленной для анализа пробы делают разведения, которые подбирают с таким расчетом, чтобы после посева на чашках Петри выросло не более 300 колоний. Для каждого разведения используется отдельная пипетка. В пробирку с 9 см³ стерильной воды переносят 1 см³ исходной взвеси и получают разведение взвеси 1:10. Аналогичным образом готовят последующие разведения. Разведения исследуемого материала по 1 см³ вносят в чашки Петри, на внешней стороне доньшка которых предварительно записывают наименование анализируемого продукта, разведение и дату анализа. Посевы

заливают 20-25 см³ расплавленного и охлажденного до 45 °С питательного агара (ПА), тщательно перемешивают круговыми движениями или покачиванием вокруг горизонтальной оси.

После застывания агара чашки переворачивают крышкой вниз и ставят в таком виде в термостат с температурой 30 °С на 72 часа. При недостатке термостатов посевы инкубируют в течение 24 часов при комнатной температуре и затем в течение 24 часов в термостате при температуре 37 °С. Учитывают те посевы, в которых выросло на чашке от 50 до 300 изолированных колоний. Подсчитываемые колонии отмечают на нижней стороне чашки чернилами или тушью. При подсчете колоний можно также пользоваться лупой с увеличением в 2-5 раз.

Количество микроорганизмов на 1 г продукта рассчитывают по формуле:

$$K = \frac{a \times b \times c}{D}, \quad (2)$$

где K – количество микроорганизмов в 1 г; a – среднеарифметическое число колоний в чашке из параллельных посевов; b – разведение; c – объем смывной воды, внесенный в чашку Петри (в см³); D – масса продукта, г.

В случае, если первоначальная навеска заливается в пропорции 1:10, то количество микроорганизмов в 1 г рассчитывают путем умножения числа колоний в чашке на 10, 100 [и т.д.] в зависимости от разведения.

Вопросы для самопроверки

1. Каковы места локализации микрофлоры на рыбе?
2. Каковы пути попадания микроорганизмов на рыбу?
3. От чего зависит численность и видовой состав микрофлоры свежей рыбы?
4. Что такое микробиологическая порча рыбы?
5. Как определить признаки микробиологической порчи рыбы?
6. Какие требования предъявляются к рыбе, направляемой на приготовление пищевой продукции?
7. По каким показателям оценивается санитарное состояние рыбы-сырца?
8. Какие технологические операции способствуют замедлению деятельности микроорганизмов на рыбе?
9. Какие технологические операции способствуют уменьшению численности микроорганизмов на рыбе?
10. Что означает «провести анализ с соблюдением правил асептики»?
11. Зачем делают разведения смывной воды при определении МАФАНМ исследуемого объекта?
12. Какой тип питания у микроорганизмов, вырастающих при их посеве

на питательном агаре (ПА)?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

Тема: Санитарно-микробиологический контроль соленой продукции

Цель занятия: Ознакомиться с методами отбора проб, подготовки их к анализу и определением количества МАФАнМ и бактерий группы кишечных палочек (коли-формы) в соленой, пряной и маринованной рыбе.

Санитарно-микробиологический контроль соленой, пряной, маринованной рыбы включает определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, наличия бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий), *St. aureus*, патогенных, в том числе *Salmonella*.

Для снижения обсемененности соленой продукции при использовании ее в качестве полуфабриката для производства пресервов, кулинарной и вяленой продукции ее рекомендуется промыть в соленом растворе или свежеприготовленном тузлуке. Для борьбы с пороками соленой рыбы по согласованию с администрацией предприятия производят обработку рыбы в уксусно-соляном растворе.

Нормативы соленой, пряной, маринованной рыбы представлены в таблице 3.

Таблица 3

Микробиологические показатели соленой, пряной и маринованной рыбы					
Объект кон- троля	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускается			
		БГКП (колиформы)	St. <i>aureus</i>	Сульфит-реду- цирующие кло- стридии	патогенные, в том числе сальмо- неллы и <i>L. mono- cytogenes</i>
Рыба соленая, пряная, маринованная					
- неразделан- ная	1·10 ⁵	0,1	-	0,1	25
- разделанная соленая и ма- лосоленая, в том числе ло- сосевые без консервантов, филе, вна- резку; с залив- ками, специ- ями, гарни- рами, расти- тельным мас- лом	1·10 ⁵	0,01	0,1	0,1	25

Задание 1. Отобрать пробы, подготовить их к анализу, произвести определение количества МАФАНМ.

Объект исследования:

Соленая, пряная или маринованная рыба.

Материалы и оборудование:

стерильные пробирки с 9 см³ физиологического раствора (0,85 % поваренной соли в дистиллированной воде) и стерильной воды, пробирки с расплавленным и охлажденным агаром, спирт; скальпель, спиртовки, стерильные ступки с пестиком, стерильные пипетки на 1-2 см³, стерильные чашки Петри, спички, стеклограф; штативы, весы на 0,5 кг, термостат.

Содержание работы

Первое занятие— ознакомиться с методами отбора проб и подготовкой их к анализу, сделать необходимые разведения из подготовленной для анализа пробы, произвести посев в пустые стерильные чашки Петри и залить их расплавленным и охлажденным РПА (рыбопептонным агаром), поместить посеvy в термостат.

Второе занятие—«прочитать» (просмотреть) посеvy, подсчитать количество выросших колоний, рассчитать количество МАФАНМ рыбы.

Техника выполнения работы

1. Отбор проб и подготовка их к анализу

Отбор проб и подготовка их к анализу проводятся с соблюдением условий асептики.

Мелкая рыба отбирается в количестве 3-10 экземпляров, измельчается целиком, растирается.

От крупных экземпляров (2-3 шт.) с двух сторон вырезают мышцы вместе с кожей вдоль позвоночника, не затрагивая кишечник. Достаточно при анализе крупных экземпляров рыб производить отбор по одной половине каждого экземпляра.

Отобранную пробу помещают во взвешенную стерильную колбу. Колбу с образцами взвешивают и по разности весов устанавливают массу отобранной пробы. Затем наливают стерильную жидкость в таком количестве, чтобы получить разведение 1:10 и приступают к анализу.

2. Определение КМАФАНМ.

Методика определения приведена в лабораторной работе №1.

Задание 2. Определить бактерии группы кишечных палочек (колиформные бактерии) в соленой продукции.

Материалы и оборудование:

среда Кесслер по 10 см³ в пробирках двойной и нормальной концентрации, среда Эндо в чашках Петри, стерильный физиологический раствор в про-

бирках; склянка со спиртом, стерильные пипетки на 1-10 см³, бактериологическая петля, предметные стекла; растворы и реактивы для окраски по Граму: карболовый раствор генциан-виолета, раствор Люголя, фуксин Циля; специальный реактив для определения оксидазной активности бактерий, состоящий из трех частей 1 %-ного спиртового раствора α -нафтола и одной части 1 %-ного водного раствора диметил-пара-финелендиамина; термостат, микроскоп.

Содержание работы

Первое занятие – освоить методику исследования, из исходной суспензии или соответствующего разведения произвести посев по 1 этапу – в пробирки со средой Кесслер и поставить в термостат.

Второе занятие – пробирки с посевами просмотреть, из газ-положительных пробирок сделать посев по 2 этапу – на среду Кесслер для подтверждения и поставить в термостат.

Третье занятие – пробирки с посевами просмотреть, из газ-положительных пробирок сделать посев для подтверждения – плотную дифференциальную среду Эндо штрихом методом истощающегося мазка

Четвертое занятие – типичные колонии, подозрительные на БГКП по культуральным признакам, промикроскопировать, окрасив по Грамму, если обнаружены мелкие грамотрицательные без спор палочки, провести тест на оксидазу.

Техника выполнения работы

Метод основан на способности бактерий группы кишечных палочек сбраживать в среде Кесслер лактозу с образованием кислоты и газа. В этой группе определяются 5 родов энтеробактерий (*E. coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*).

Бактерии группы кишечных палочек (БГКП) – это аэробные и факультативно-анаэробные грамотрицательные, не образующие спор палочки, ферментирующие лактозу с образованием кислоты и газа при температуре 37 °С в течение 24 ч (бродильная проба), не обладающие оксидазной активностью.

1 этап– для определения БГКП 10 см³ исходной суспензии продукта или соответствующего разведения засевают в пробирки с 10 см³ питательной среды с поплавками или ватными тампонами двойной концентрации. Засевается то количество продукта, в котором нормируется отсутствие бактерий группы кишечных палочек. Посевы инкубируют при температуре 37 °С.

2 этап– через 24 ч из газ-положительных пробирок инокулируют с пробирок двойной концентрации в 2 пробирки со средой Кесслер нормальной концентрации. Посевы инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 ч.

3 этап – со среды Кесслер проводят посев на плотную дифференциальную среду Эндо. Посев производят петлей штрихами на поверхность среды Эндо (в чашку Петри), разделенной на 3-4 сектора стеклографом с внешней стороны доньшка (посевной материал следует брать с таким расчетом, чтобы

получить изолированные колонии). Чашки с засеянной средой Эндо переворачивают вверх дном, заворачивают в плотную бумагу для предотвращения засвечивания среды на свету и инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 ч.

4 этап – «читают» посевы на среде Эндо.

При наличии на среде Эндо колоний (слабовыпуклых, с ровным краем, с мажущейся консистенцией, гомогенной структуры, красных с металлическим блеском и без него, розовых), характерных для группы кишечных палочек, производят их изучение. Из изолированных колоний готовят препараты, окрашивают по Граму и микроскопируют. При наличии грамотрицательных без спор палочек делают заключение о присутствии БГКП.

При обнаружении грамотрицательных, не образующих спор палочек, выполняют оксидазный тест. Для этого колонии со среды Эндо наносят штрихом на фильтровальную бумагу, предварительно смоченную реактивом для определения цитохромоксидазы. В месте нанесения бактериальной массы бумага не изменяет цвета, если оксидазный тест отрицательный, и синее в течение 1 мин, если бактерии имеют оксидазу.

Вопросы самоконтроля

1. Каково значение поваренной соли при посоле рыбы?
2. Какими причинами объясняется консервирующее действие соли?
3. Какое влияние оказывает изменение рН среды на консервирующее действие соли?
4. На какие группы подразделяются микроорганизмы в зависимости от чувствительности к поваренной соли?
5. Какие микроорганизмы могут размножаться в питательной среде, содержащей свыше 6-8 % поваренной соли?
6. Как изменяется количественный и качественный состав микрофлоры рыбы в процессе ее посола и хранения?
7. В результате каких нарушений технологии посола и хранения соленой продукции могут возникать следующие дефекты: фуксин, окисление жира, омыление?
8. Какие микроорганизмы вызывают микробную порчу соленой рыбы?
9. Каковы правила отбора проб соленой, пряной, маринованной рыбы и доставки их в лабораторию?
10. Зачем делают разведения смывной воды для определения КМАФАнМ исследуемого объекта?
11. Какие меры можно принять для снижения КМАФАнМ соленой продукции при использовании ее в качестве полуфабриката?
12. Опишите метод определения бактерий группы кишечных палочек.
13. Каковы морфологические признаки БГКП, выявляемых в посевах

соленой продукции?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

Тема: Санитарно-микробиологический контроль икры

Цель занятия: Ознакомиться с методами отбора проб, подготовки их к анализу, освоить методики определения биологической безопасности икры баночной и бочоночной.

Санитарно-микробиологический контроль икры включает определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, наличия бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий), *St. aureus*, патогенных, в том числе *Salmonella*, плесеней, дрожжей. В баночной икре определяются сульфитредуцирующие клостридии.

Нормативы икры представлены в таблице 4.

Таблица 4

Объект контроля	КМА-ФАНМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускается				Плесени, КОЕ/г, не более	Дрожжи, КОЕ/г, не более	Примечание
		БГКП (колиформы)	<i>St. aureus</i>	сульфитредуцирующие клостридии	патогенные, в том числе сальмонеллы и <i>L. monocytogenes</i>			
Молоки и икра ястычная, охлажденные и мороженые	$5 \cdot 10^4$	0,001	0,01	-	25	-	-	<i>V. parahaemolyticus</i> – не более 100 КОЕ/г, для морской рыбы
Молоки соленые	$1 \cdot 10^5$	0,1	0,1	-	25	-	-	-
Кулинарные икорные продукты:								
- с термической обработкой	$1 \cdot 10^4$	1,0	1,0	-	25	-	-	<i>Proteus</i> 0,1 г не допускается
- многокомпонентные блюда без термической обработки после	$2 \cdot 10^5$	0,1	0,1	-	25	-	-	

смешива- ния								
Икра осетровых рыб:								
- зернистая баночная, паюсная	1·10 ⁴	1,0	1,0	1,0	25	50	50	*масса (г), в которой не допус- кается
- зернистая пастеризо- ванная	1·10 ³	1,0	1,0	1,0	25	0,1*	0,1*	
- ястычная слабосоле- ная, соле- ная	5·10 ⁴	1,0	1,0	1,0	25	50	100	
Икра лососевых рыб зернистая соленая								
- баночная, бочковая	1·10 ⁵	1,0	1,0	1,0	25	50	300	
- из заморо- женных ястыков	5·10 ⁴	1,0	1,0	1,0	25	50	200	
Икра других видов рыб								
- пробойная соленая; ястычная слабосоле- ная, копче- ная, вяле- ная	1·10 ⁵	0,1	1,0	1,0	25	50	300	*масса (г), в которой не допус- кается
- пастеризо- ванная	5·10 ³	1,0	1,0	1,0	25	0,1*	0,1*	
Аналоги икры, в т.ч. белковые	1·10 ⁴	0,1	1,0	0,1	25	50	50	

Задание 1. Отобрать пробы, подготовить их к анализу, произвести определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, провести посевы для определения бактерий группы кишечных палочек.

Объект исследования:

икра осетровых рыб (зернистая баночная, паюсная, ястычная слабосоленая, соленая); икра лососевых рыб (зернистая баночная и бочоночная); икра других видов рыб: мойвы, минтая, нототении, трески, палтуса и т.д. (пробойная соленая, пастеризованная, ястычная слабосоленая, соленая, копченая, вяленая); икра белковая (черная, красная) – искусственная.

Материалы и оборудование:

для определения КМАФАнМ: стерильные пробирки с 9 см³ физиологи-

ческого раствора и стерильной воды, пробирки с расплавленным и охлажденным агаром, спирт; скальпель, спиртовка, вата, теплая вода для мойки банок, стерильные пипетки на 1-2 см³, стерильные чашки Петри, штативы, весы на 0,5 кг;

для определения БГКП: стерильные флаконы с 10 см³ среды Кесслер двойной концентрации, стерильные пробирки с 10 см³ среды Кесслер нормальной концентрации, чашки Петри со средой Эндо; бактериологическая петля, предметные стекла, красители для окраски по Граму; термостат, микроскоп.

Содержание работы

Первое занятие – ознакомиться с методами отбора проб и подготовкой их к анализу, сделать необходимые разведения из подготовленной для анализа пробы, посеять на РПА в чашки Петри для определения количества МАФАНМ и в пробирки со средой Кесслер с целью определения БГКП, поместить посе́вы в термостат.

Второе занятие – «прочитать» (просмотреть) посе́вы предыдущего занятия; подсчитать количество колоний, выросших на РПА в чашках Петри, рассчитать КМАФАНМ икры; учесть результаты культивирования посе́вов на среде Кесслер, из газ-положительных пробирок сделать посев на среду Эндо и поставить в термостат.

Третье занятие – промикроскопировать, окрасив по Граму, те культуры, выросшие на среде Эндо, которые имеют культуральные признаки БГКП, провести тест на оксидазу, если при микроскопировании обнаружены мелкие грамотрицательные беспоровые палочки, сделать вывод о наличии или отсутствии в 1 г исследуемой пробы икры бактерии группы кишечных палочек.

Техника выполнения работы

1. Отбор проб и подготовка их к анализу.

Отбор проб икры, расфасованной в бочки, проводят щупом из верхнего, среднего и нижнего слоев. Для анализа отбирают до 3 % единиц расфасовки, но не менее трех бочек. Общая масса среднего образца должна быть около 100 г.

Для выборки икры, расфасованной в металлические банки с надвигающимися крышками вместимостью от 500 см³ и более, отбирают по ассортименту (осетр, белуга, севрюга) по 3 банки разных переделов и составляют среднюю пробу массой 50 г.

Отбор зернистой и паюсной икры, идущей на экспорт, производят из трех банок одного передела выборочно по виду обработки, расфасовки, консерванту от каждой пяти дат выработки общей массой 50 г. От навески 50 г передается 25 г для исследований на сальмонеллы.

При расфасовке икры в металлическую, стеклянную или другую тару вместимостью до 300 см³ отбирают по 1 ед. расфасовки.

Пастеризованная икра берется на анализ по каждому виду тары и по ассортименту в количестве около 100 г (3 одноунцовые банки, 2 двухунцовые и 1 трехунцовая). При этом как из трех банок, так и из двух составляются средние пробы.

Ястычную икру (соленую, вяленую, копченую) в потребительской таре, полиэтиленовых мешках или картонных коробках отбирают, вырезая несколько кусочков из разных мест общей массой 100 г.

При определении сальмонелл в икре дополнительно берется навеска около 100 г.

Белковая икра отбирается в количестве 1 банки по каждому виду тары и по ассортименту.

Отобранную среднюю пробу тщательно перемешивают (икра-зерно целое), растирают (паюсная, белковая икра), измельчают (ястычная икра) и отбирают в стерильную емкость навески икры массой 10 г. К навеске добавляют 0,1 %-ный раствор пептонной воды до 100 см³. Это будет исходное разведение (10^{-1}) для определения общей бактериальной обсемененности. Подготовленный неразведенный продукт можно высевать непосредственно в питательные среды.

2. Определение количества МАФАНМ.

Методика определения количества МАФАНМ дана в описании лабораторной работы № 1.

3. Определение бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий).

Методика определения БГКП представлена в лабораторной работе № 2.

Задание 2. Провести определение плесневых грибов и дрожжей.

Материалы и оборудование:

среда Сабуро; стерильные чашки Петри, спиртовка, стерильные пипетки на 1 см³, бактериологическая петля, предметные стекла, красители для окраски по Грамму; термостат, микроскоп.

Содержание работы

Первое занятие – сделать посевы для выявления дрожжей и плесневых грибов и поставить в термостат.

Второе занятие – «прочитать» (просмотреть) посевы и дать заключение о наличии дрожжей и плесневых грибов на продукции.

Техника выполнения работы

Метод основан на способности плесневых грибов и дрожжей расти на элективных средах в аэробных условиях при термостатировании посевов при температуре 25 °С.

1 см³ исходного разведения (10^{-1}), полученного при определении общей бактериальной обсемененности, высевают в чашки Петри и заливают плотной питательной средой Сабуро. Чашки вверх крышками ставят в термостат при

температуре 25 °С. Через 5 суток просматривают посевы.

Развитие плесневых грибов на питательных средах сопровождается появлением мицелия различной окраски.

Рост дрожжей сопровождается образованием выпуклых, блестящих, серовато-белых, кремовых колоний с ровным краем.

При необходимости для разделения колоний дрожжей и плесневых грибов проводят микроскопирование. Результаты микроскопирования оценивают по ГОСТ 10444.12-2013.

Для количественного подсчета отбирают чашки, на которых выросло от 15 до 150 колоний дрожжей и (или) от 5 до 50 колоний плесневых грибов.

Задание 3. Провести определение золотистых стафилококков.

Материалы и оборудование:

пробирки с соевым или сахарным бульоном, чашки Петри со стерильным молочно-соевым или желточно-соевым агаром, пробирки со скошенным питательным агаром, сухая кроличья плазма, пробирки со стерильным физиологическим раствором.

Содержание работы

Первое занятие– освоить методику исследования, сделать посев по 1 этапу – в соевый бульон и поставить в термостат.

Второе занятие– пробирки с посевами просмотреть, отобрать с мутью или осадком и сделать посев на молочно-соевый агар, поставить в термостат.

Третье занятие– колонии, подозрительные на стафилококк по культуральным признакам, промикроскопировать, окрасив по Граму, грамположительные мелкие кокки пересеять для накопления на скошенный питательный агар, поставить в термостат.

Четвертое занятие– определить принадлежность выделенного стафилококка к коагулазоположительным стафилококкам, для чего установить у него свойство свертывать плазму.

Техника выполнения работы

Метод основан на выявлении характерного роста бактерий на элективных средах, изучении морфологических свойств, постановке теста плазмокоагуляции.

1 этап: в пробирку с 10 см³ соевого или сахарного бульона вносят 1 см³ исходной суспензии. Посевы помещают в термостат при температуре 37 °С на 24 ч.

2 этап: для получения изолированных колоний стерильной петлей производят посев на элективные среды: желточно- или молочно-соевый агар методом Дригальского или по Минкевичу. Посевы на желточно-соевом агаре инкубируют при 37 °С в течение 24 ч, на молочно-соевом – при 37 °С в течение 24 ч и еще сутки при комнатной температуре.

3 этап: подозрительные на стафилококки колонии (непрозрачные, золотистые, кремовые, эмалевые, лимонно-желтые, имеющие форму правильных дисков от 2 до 4 мм в диаметре, слегка выпуклые, с ровными краями, на желточно-солевом агаре – с радужным венчиком вокруг колоний) микроскопируют с окраской по Граму.

Стафилококки положительно окрашиваются по Граму, имеют шарообразную форму с диаметром 0,6-1 мкм, располагаются часто в виде скоплений, напоминающих гроздь винограда.

При обнаружении грамположительных мелких кокков культуры отсеивают на скошенный агар и инкубируют при температуре 37 °С 18-24 ч. Число колоний, взятых для идентификации, не должно быть менее пяти.

4 этап: дальнейшие исследования направлены на определение патогенности стафилококка.

Основным тестом, определяющим патогенность стафилококка, является реакция плазмокоагуляции. Патогенные стафилококки коагулируют плазму человека и теплокровных животных.

С односуточной культурой ставят реакцию плазмокоагуляции.

Реакция плазмокоагуляции. Соблюдая правила асептики, в стерильные пробирки подходящего размера добавляют 0,1 см³ каждой культуры, выросшей на среде и 0,3 см³ плазмы кролика (если изготовителем кроличьей плазмы не установлены другие количества) и инкубируют при температуре 37 °С.

Опрокидывая пробирку, исследуют плазму на свертывание после 4-6 ч инкубирования и, если тест отрицательный, просматривают через 24 ч инкубирования или исследуют после инкубационного периода продолжительностью, установленной изготовителем кроличьей плазмы.

Задание 4. Провести определение сульфитредуцирующих клостридий.

Материалы и оборудование:

пробирки с 10-13 см³ питательной среды: сульфитполимиксиновой или Вильсон-Блера, или Кит-Тароцци; реактивы для определения каталазной реакции: 10 %-ный раствор едкой щелочи или 10 %-ный раствор соляной кислоты, 3 %-ный раствор перекиси водорода, индикаторная бумага.

Содержание работы

Первое занятие – освоить методику исследования, сделать посевы для выявления сульфитредуцирующих клостридий в пробирки с питательной средой и поставить в термостат.

Второе занятие – пробирки с посевами просмотреть, при наличии почернения питательной среды, приготовить мазки-препараты, окрасить по Граму и промикроскопировать; если при микроскопировании обнаружены грамположительные споровые палочки, провести каталазную реакцию.

Техника выполнения работы

Метод основан на способности клостридий вызывать почернение среды определенного состава в результате образования сернистого железа.

Навеску продукта массой 1 г или его разведений 1:10 (0,1 г), 1:100 (0,01 г) вносят в пробирку с 10-15 см³ питательной среды: сульфитполимиксиновой или Вильсон-Блера, предварительно расплавленной и остуженной до 45 °С, или Китт-Тароцци.

Инкубацию проводят при температуре 37 °С 20-24 ч. При наличии роста клостридий в средах Вильсон-Блера, сульфитполимиксиновой образуется почернение и разрывы среды. Из среды Китт-Тароцци, где наблюдается рост, пастеровской пипеткой производят пересев на дно стерильной пробирки и заливают расплавленной средой Вильсон-Блера высоким столбиком. При росте сульфитредуцирующих клостридий в результате восстановления сернистого натрия происходит взаимодействие его с хлористым железом, среда чернеет за счет образования сернистого железа. Изготавливают мазки-препараты, окрашивают по Граму и микроскопируют. Сульфитредуцирующие клостридии представляют собой грамположительные короткие, толстые с закругленными краями палочки, располагающиеся в одиночку, попарно в виде цепочек или скоплений параллельных клеток (забором). При спорообразовании споры овальные или сферические, центральные, субтерминальные или терминальные. Сульфитредуцирующие клостридии каталазы не образуют, являются строгими анаэробами.

Каталазная реакция: к части культуральной жидкости добавляют 10%-ный раствор едкой щелочи или 10%-ный раствор соляной кислоты в таком количестве, чтобы питательная среда приобрела нейтральную реакцию (по индикаторной бумажке). Затем обезжиренной пипеткой 0,5 см³ жидкости переносят на профламбированное, обезжиренное и охлажденное до комнатной температуры предметное стекло, а затем другой пипеткой добавляют каплю 3%-ного раствора перекиси водорода. Если в течение 3 мин пузырьки газа не появились, считается, что микроорганизмы каталазы не образуют.

Отрицательная проба на каталазу свидетельствует о присутствии в среде облигатных анаэробных микроорганизмов.

Задание 5. Провести определение бактерий рода сальмонелл.

Материалы и оборудование:

забуференная пептонная вода, стерильные пробирки с 10 см³ среды обогащения (селенитовый бульон), стерильные чашки Петри с дифференциально-диагностической средой (Висмут-сульфит агар, среда Плоскирева, Левина или Эндо), пробирки со средой Олькеницкого, агаром Клиглера, агар Кристенсена с мочевиной; пробирки со скошенным агаром, среды Гисса с маннитом или сахарозой, бульо Хоттингера или мясо-пептонный бульо с L-триптофаном; монорецепторные Н- и О-сыворотки.

Содержание работы

Первое занятие – освоить методику по приготовлению исходной суспензии, используя неселективную среду (забуференную пептонную воду), в соотношении 1:10. Исходную суспензию инкубируют при температуре 37 °С в течение 18 ч.

Второе занятие – сделать посев в среду обогащения (селенитовый бульон) и поместить в термостат при температуре 37 °С.

Третье занятие – через 24 ч из сред обогащения сделать высев на плотные дифференциально-диагностические среды (висмут-сульфит агар) и поставить в термостат при температуре 37 °С.

Четвертое занятие – колонии, подозрительные на бактерии рода сальмонелл по культуральным признакам, промикроскопировать, окрасив по Граму; для идентификации взять не менее пяти колоний и пересеять на скошенный питательный агар.

Пятое занятие – из пробирок культуры пересевают штрихом на скошенный агар и уколом – столбик (среды Олькеницкого) и на агара Клиглера или Кристенсена с мочевиной. Для определения ферментации маннита и сахарозы культуры пересевают на среду Гисса, и для определения образования индола в пробирки с бульоном Хоттингера или МПБ. Посевы инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 ч.

Шестое занятие – интерпретируют изменения в среде: среда Олькеницкого столбик агара: желтый – ферментирует глюкозу, красный или неизменившийся – глюкозу не ферментирует, черный – образование сероводорода, пузырьки или разрывы – образование газа из глюкозы; скошенная поверхность агара Олькеницкого: желтая – лактозу и/или сахарозу ферментирует, красная или неизменившаяся – лактозу и/или сахарозу не ферментирует; агар Клиглера по скошенной поверхности учитывают только ферментацию лактозы (типичные колонии сальмонелл показывают щелочную (красную) поверхность и кислый (желтый) столбик с образованием газа (пузырьков) и образуется сероводород (черный агар)); на агаре Кристенсена при положительной реакции – расщеплении мочевины с выделением аммония цвет фенолового красного меняется с розового до светло-вишневого. Бактерии рода *Salmonella* расщепляют мочевины, не ферментируют сахарозу, но ферментируют манит, не образуют индол. При сбраживании маннита изменяется цвет среды, образуется или не образуется газ.

Седьмое занятие – для окончательного заключения у выделенных культур изучить серологические свойства путем постановки реакции агглютинации с сальмонеллезными сыворотками, сделать заключение о присутствии в исследуемом продукте сальмонелл.

Техника выполнения работы

Метод основан на способности бактерий рода сальмонелл расти на дифференциально-диагностических средах образовывать специфические колонии

и давать реакцию агглютинации с сальмонеллезными сыворотками.

К бактериям рода сальмонелл относятся граммотрицательные палочки с закругленными концами, длина варьирует от 1 до 5 мк, ширина от 0,5 до 0,6 мк. Сальмонеллы являются факультативными анаэробами. Оптимальная температура роста 37 °С, реакция среды слабощелочная (рН 7,2-7,4). Сальмонеллы подвижны.

Навеску продукта в количестве 25 г засевают в 250 см³ забуференную пептонную воду. Посевы помещают на 18 ч в термостат при температуре 37 °С.

После инкубирования 1 см³ культуры пересевают в 10 см³ селенитового бульона. Посевы инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 ч.

Далее из сред обогащения делают высев в чашки Петри на плотные дифференциально-диагностические среды: Висмут-сульфит агар (ВСА), среду Плоскирева, Левина или Эндо. Перед посевом среду необходимо подсушить в термостате. Чашки термостатируют при температуре 37 °С в течение 24 ч.

На ВСА сальмонеллы образуют черные (или коричневые) с металлическим блеском колонии, цвет среды под колониями черный. Исключение составляют *S. paratyphi*, *S. cholerae suis* и ряд других, растущих в виде мелких серовато-зеленых колоний с черным центром и без него.

На среде Эндо колонии сальмонелл бесцветные, слабо-розовые, выпуклые, блестящие. На средах Плоскирева и Левина колонии прозрачные, голубоватые, бледные или нежно-розовые.

С дифференциально-диагностических сред отсевают несколько колоний на среду Олькеницкого, Клигlera, Кристенсена с мочевиной, Гисса с маннитом и сахарозой, бульон Хоттингера (или МПБ). Посевы делают сначала штрихом по скошенной поверхности, а затем уколom (два раза) в глубину столбика. Посевы выдерживают в термостате при температуре 37 °С 24 ч. Учитывают способность культуры ферментировать глюкозу, лактозу и мочевину. Для сальмонелл характерно разложение глюкозы с образованием газа. Лактозу и мочевину не разлагают. Отсутствие изменения цвета скошенной поверхности указывает на то, что лактоза и сахароза не разлагаются исследуемой культурой. Желтое окрашивание столбика, образование газа (разрывы) и сероводорода (почернение) указывает на рост бактерий из рода сальмонелл.

Таким образом, к сальмонеллам относятся бактерии, не разлагающие лактозу, сахарозу и мочевину, ферментирующие глюкозу, маннит с образованием газа, продуцирующие сероводород и не образующие индол. Для окончательного заключения у выделенных культур должны быть изучены серологические свойства.

Сальмонеллы обладают двумя основными антигенными комплексами. Различают жгутиковые (H) антигены и соматические (O). Антигенная структура сальмонелл расшифровывается с помощью монорецепторных H- и O-сывороток.

Подготовка сывороток к постановке реакции агглютинации и методика проведения указаны в инструкции, прилагаемой к сыворотке.

Наличие О-антигенов проявляется в виде склеивания бактериальной массы и полного или частичного просветления жидкости. При отрицательной реакции культура после тщательного смешивания с каплей сыворотки образует гомогенную смесь.

При выявлении Н-антигенов испытуемой культурой инокулируют полужидкий агар. Посевы инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 ч. Полученную культуру используют для выявления Н-антигенов.

Для реакции агглютинации с О-сыворотками берут односуточную культуру с верхней части, с Н-сыворотками – с нижней части скошенного питательного агара.

В случае положительной реакции агглютинации с монорецепторными О-Н-сыворотками делают окончательный вывод о присутствии в исследуемом образце сальмонелл.

Вопросы самоконтроля

1. Какие санитарно-гигиенические требования необходимо соблюдать при производстве икорных продуктов?
2. Назовите микроорганизмы, встречающиеся в икре, и источники обсеменения икры микроорганизмами?
3. Какие технологические операции способствуют подавлению жизнедеятельности микроорганизмов икры?
4. Какие микроорганизмы являются возбудителями порчи икорной продукции?
5. Какие виды микробиологического контроля осуществляются на рыбообрабатывающих предприятиях?
6. Назовите точки санитарно-микробиологического контроля производства икры.
7. В каких случаях проводится бактериологический анализ готовой продукции?
8. Как отбирается проба икры для анализа?
9. Какое число клеток золотистых стафилококков допускается в 1 г икорных продуктов?
10. Опишите метод определения золотистых стафилококков.
11. Какова физиология коагулазоположительного стафилококка (тип дыхания, тип питания, отношение к температуре, рН, концентрации соли)?
12. Что такое интоксикация и токсикоинфекция и чем они обусловлены?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

Тема: Санитарно-микробиологический контроль пресервов

Цель занятия: Провести определение биологической безопасности готовых пресервов.

Санитарно-микробиологический контроль пресервов включает определение мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (в том числе плесеней и дрожжей), наличие бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий), *St. aureus*, патогенных, в том числе *Salmonella*, сульфитредуцирующих клостридий (табл.5).

Пресервы с учетом технологии приготовления и уровня бактериальной обсемененности для удобства осуществления микробиологического контроля условно разделены на три группы.

К I группе относятся пресервы пряного и специального посола, ко II - пресервы из рыбы и морских беспозвоночных в масле, соусах, заливках и маринадах, к III – пресервы пастообразные.

В пресервах выявляют количество

Таблица 5

Микробиологический контроль пресервов					
Объект контроля	КМА-ФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускается			
		БГКП (колиформы)	<i>St. aureus</i>	Сульфит-редуцирующие клостридии	патогенные, в том числе сальмонеллы и <i>L. monocytogenes</i>
Пресервы пряного и специального посола из неразделанной рыбы*	$1 \cdot 10^5$	0,01	-	0,01	25
Пресервы малосоленые пряного и специального посола из рыбы:					
- неразделанной*	$1 \cdot 10^5$	0,01	1,0	0,01	25
- разделанной*	$5 \cdot 10^4$	0,01	1,0	0,01	25
Пресервы «Пасты»:					
сов, с гарнирами и без гарниров (в том числе из лососевых рыб в масле)*	$2 \cdot 10^5$	0,01	1,0	0,01	25
- пасты рыбные*	$5 \cdot 10^5$	0,01	0,1	0,01	25
- из белковой	$1 \cdot 10^5$	0,1	0,1	0,1	25

пасты* Пресервы из термически обработанной рыбы*	$5 \cdot 10^4$	1,0	1,0	1,0	
--	----------------	-----	-----	-----	--

*Плесени – не более 10 КОЕ/г, дрожжи – не более 100 КОЕ/г

Задание 1. Отобрать пробы, подготовить их к анализу, выявить количество мезофильных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, наличие бактерий группы кишечных палочек, сальмонелл при проведении основного микробиологического контроля пресервов.

Объект исследования:

пресервы пряного и специального посола, пресервы из рыбы и морских беспозвоночных в масле, соусах, заливках и маринадах, пастообразные пресервы.

Материалы и оборудование:

стерильные флаконы с 0,1 %-ным раствором пептонной воды, пробирки с 9 см³ стерильной воды, спирт; стерильные пробирки, пипетки на 1 см³, спиртовки, спички, стеклограф, вата, теплая вода для мытья банок, мыло; штативы, весы на 0,5 кг, термостат.

Содержание работы

Работа выполняется по алгоритму задания 1 в лабораторной работе № 3.

Техника выполнения работы

1. Отбор проб и подготовка их к анализу.

Пробы пресервов отбирают через 2 ч после закатки банок. Для анализа берут 2 банки. Каждая банка анализируется в отдельности.

При анализе пресервов пряного или специального посола пробу отбирают из тузлука. Предварительно пресервы тщательно встряхивают. Из пресервов в масле, соусах, где, как правило, небольшое количество жидкой фазы, содержимое банки смешивают с равным количеством 0,1 %-ного раствора пептонной воды, которую учитывают при анализе, перевешивают, затем готовят десятикратные разведения. Из пастообразных пресервов отбирают навески по 10 г, которые вносят в 90 см³ жидкости для приготовления разведения.

2. Определение количества МАФАНМ.

Методика определения КМАФАнМ дана в описании лабораторной работы № 1.

3. Определение бактерий группы кишечных палочек.

Методика представлена в лабораторной работе № 2.

4. Определение бактерий род сальмонелл.

Методика определения дана в описании лабораторной работы № 3.

Задание 2. Сделать анализ пресервов при осуществлении дополнительного микробиологического контроля на КМАФАнМ, присутствие БГКП, золотистых стафилококков, сульфитредуцирующих клостридий, плесневых грибов и дрожжей, сальмонелл.

1. Определение количества МАФАнМ.

2. Определение бактерий группы кишечных палочек.

3. Определение золотистых стафилококков.

Методика определения дана в описании лабораторной работы № 3.

4. Определение сульфитредуцирующих клостридий (сульфит-восстановителей).

Методика определения дана в описании лабораторной работы № 3.

5. Определение плесневых грибов и дрожжей.

Методика определения дана в описании лабораторной работы № 3.

6. Определение бактерий род сальмонелл.

Методика определения дана в описании лабораторной работы № 3.

Вопросы самоконтроля

1. Что такое пресервы?

2. Каковы пути попадания микроорганизмов в пресервы?

3. Какие микробиологические процессы протекают при созревании пресервов?

4. Почему пресервы следует хранить при пониженной температуре?

5. Назовите наиболее распространенные виды порчи пресервов и меры предотвращения их.

6. На какие группы с учетом технологии приготовления и уровня бактериальной обсемененности разделяются пресервы?

7. В каких случаях исследуются пресервы I группы?

8. Как осуществляется отбор проб пресервов и подготовка их к анализу?

9. В чем заключается сущность метода определения сульфитредуцирующих клостридий?

10. Каковы морфологические признаки сульфитредуцирующих клостридий?

11. С какой целью осуществляется проведение каталазной реакции?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5

Тема: Санитарно-микробиологический контроль вяленой рыбы

Цель занятия: Ознакомиться с методами отбора проб, подготовки их к анализу, провести микробиологический контроль производства вяленой продукции.

Санитарно-микробиологический контроль вяленой рыбы включает определение мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (в том числе плесеней и дрожжей), наличие бактерий группы кишечных палочек, *St. aureus*, патогенных, в том числе *Salmonella*, сульфитредуцирующих клостридий (табл.6).

Учитывая определенную специфичность в технологии приготовления вяленой рыбы, характер и уровень ее бактериальной обсемененности вся вяленая продукция для удобства осуществления микробиологического контроля делится условно на две группы.

К I группе относятся вяленая рыба и морские беспозвоночные, ко II – провесная (подвяленная) рыба.

Таблица 6

Основной микробиологический контроль вяленой продукции					
Объект контроля	КМАФАнМ КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускается			
		БГКП	дрожжи и плесени, КОЕ/г, не более	сульфитредуцирующие клостридии	патогенные, в том числе сальмонеллы
Рыба вяленая	$5 \cdot 10^4$	0,1	плесени – 50; дрожжи – 100	1,0	25
Основной микробиологический контроль сушеной рыбы и сухих супов					
Рыба сушеная	$5 \cdot 10^4$	1,0	100	0,01	25
Супы сухие с рыбой, требующие варки	$5 \cdot 10^5$	0,01	100	-	25
Микробиологический контроль сушеных и белковых объектов морского промысла					
Объект контроля	КМАФАнМ КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускается			
		БГКП	<i>St. aureus</i>	сульфитредуцирующие клостридии	патогенные, в том числе сальмонеллы
Сухой мидийный бульон	$5 \cdot 10^4$	0,1	-	0,01	25

льон, буль- онные ку- бики и пасты, бе- лок изоли- рованный Гидролизат из мидий (МИГИ-К)	$5 \cdot 10^3$	1,0	1,0	-	25
--	----------------	-----	-----	---	----

Задание 1. Отобрать пробы вяленой рыбы, подготовить их к анализу, определить КМАФАнМ, БГКП, сульфитредуцирующие кластридии, плесневые грибы, патогенную микрофлору, в том числе сальмонеллы, и сделать вывод о санитарном состоянии готовой продукции.

Объект исследования:

вяленая рыба, вяленые морские беспозвоночные, провесная (подвяленная) рыба.

Материалы и оборудование:

колбы с 90 см³ стерильной воды, спирт; скальпель, металлическая лопатка, спиртовки, стерильные ступки с пестиком или измельчитель, стерильные пипетки на 1-2 см³, стерильные чашки Петри, спички, стеклограф; весы на 0,5 кг, штативы, термостат.

Содержание работы

Работа выполняется по алгоритму задания 1 в лабораторной работе № 3.

Техника выполнения работы

1. Отбор проб и подготовка их к анализу.

Мелкую рыбу отбирают (3-10 шт.) из разных мест обследуемой партии. Пробу составляют из целых экземпляров рыб, предварительно сняв с них кожу в стерильных условиях. От 3-4-х экземпляров крупной рыбы после снятия кожи вырезают 6-8 поперечных кусочков толщиной 1,0-1,5 см от приголовной, средней и хвостовой частей (не затрагивая кишечник). Пробу измельчают, гомогенизируют, отвешивают навеску 10 г и помещают в 90 см³ жидкости для приготовления разведения.

2. Определение количества МАФАнМ.

Методика определения КМАФАнМ дана в описании лабораторной работы № 2.

3. Определение бактерий группы кишечных палочек.

Методика представлена в лабораторной работе № 2.

4. Определение сульфитредуцирующих кластридий (сульфит-восстановителей).

Методика определения дана в описании лабораторной работы № 3.

5. Определение плесневых грибов и дрожжей.

Методика определения дана в описании лабораторной работы № 3.

6. Определение бактерий род сальмонелл.

Методика определения дана в описании лабораторной работы № 3.

Вопросы самоконтроля

1. Каковы микробиологические основы консервирования рыбы вялением?

2. Какое действие на микроорганизмы оказывают следующие факторы: влажность и осмотическое давление среды?

3. Приведите примеры микробиологической порчи вяленой продукции.

4. Какую вяленую продукцию анализируют при проведении основного микробиологического контроля?

5. Какие показатели определяются при микробиологическом контроле вяленой рыбы?

6. Каковы правила отбор проб вяленой продукции?

7. Охарактеризуйте метод определения плесневых грибов.

8. Каковы культуральные признаки плесневых грибов и дрожжей?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6

Тема: Санитарно-микробиологический контроль копченой продукции.

Цель занятия: Ознакомиться с методами отбора проб, подготовки их к анализу, провести микробиологический контроль производства копченой продукции.

Санитарно-микробиологический контроль копченой продукции включает определениемезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (в том числе плесеней и дрожжей), наличие бактерий группы кишечных палочек, *St. aureus*, патогенных, в том числе *Salmonella*, сульфитредуцирующих клостридий (табл.7).

Горячее копчение – это процесс, при котором тепловая обработка рыбы производится при температуре выше 60 °С. Продукция горячего копчения относится к скоропортящейся, так как является благоприятной средой для развития микроорганизмов.

Таблица 7

Микробиологические показатели рыбной продукции горячего и холодного копчения					
Объект контроля	КМАФАнМ КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускается			
		БГКП	<i>St. aureus</i>	сульфитредуцирующие	патогенные, в том числе

				кlostридии	сальмонеллы и <i>L. monocyto- genes</i>
Рыбная продукция горячего копчения, в том числе замороженная	$1 \cdot 10^4$	1,0	1,0	0,1*	25
Рыбная продукция холодного копчения:					
- замороженная	$1 \cdot 10^4$	0,1	1,0	0,1	25
- внарезку (куском, сре- вировочная)	$3 \cdot 10^4$	0,1	1,0	0,1*	25
- балычные изделия хо- лодного коп- чения вна- резку	$7,5 \cdot 10^4$	0,1	1,0	0,1*	25
-ассорти рыб- ное, ветчина, фарш балыч- ный, изделия с пряностями	$1 \cdot 10^5$	0,01	0,1	0,1*	25
Филе малосо- леное, под- копченное, заморожен- ное, упако- ванное под вакуумом	$5 \cdot 10^4$	0,1	0,1	0,1	25

*В упакованной под вакуумом; *V. parahaemolyticus* – не более 10 КОЕ/г для морской рыбы

При холодном копчении тепловая обработка рыбы производится при температуре до 40 °С. Низкая влажность продукта (массовая доля влаги - не выше 66 %), содержание соли до 6-8 % и антисептические вещества, содержащиеся в коптильном дыму, делают продукцию более стойкой в хранении, чем продукцию горячего копчения.

Основной микробиологический контроль рыбы горячего и холодного копчения представлен в таблице 7.

Контролю подвергается готовая продукция горячего копчения: рыба, рулеты, колбасы, рыба копчено-мороженная, рыба с добавлением специй; продукция холодного копчения: рыба, ассорти рыбное, ветчина, фарш балычный, балычные изделия в нарезку, рыба с добавлением пряностей.

Контроль включает определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, наличия бактерий группы кишечных палочек, золотистых стафилококков, сульфитредуцирующих клостридий, сальмонелл, а также по эпидпоказателям паразитических вибрионов.

Кроме анализа готовой продукции, основным контролем предусматривается проведение санитарно-микробиологических анализов.

В случае стойкой повышенной обсемененности проводится дополнительный контроль, включающий анализы сырья после разделки и мойки, полуфабрикатов по технологическому процессу и вспомогательных материалов.

Для определения источника обсеменения повторно контролируется санитарное состояние производства.

Задание 1. Отобрать пробы, подготовить их к анализу, сделать анализ копченой продукции при осуществлении основного контроля на КМАФАнМ, наличие БГКП, сульфитредуцирующих клостридий, золотистых стафилококков, сальмонелл.

Объект исследования:

продукция горячего копчения: рыба, рулеты, колбасы, рыба копчено-мороженная, рыба с добавлением специй;

продукция холодного копчения: рыба, ассорти рыбное, ветчина, фарш балычный, балычные изделия в нарезку, рыба с добавлением пряностей.

Материалы и оборудование:

колбы с 90 см³ стерильной воды, спирт; скальпель, металлическая лопатка, спиртовки, стерильные ступки с пестиком или измельчитель, стерильные пипетки на 1-2 см³, стерильные чашки Петри; весы на 0,5 кг, штативы, термостат.

Содержание работы

Работа выполняется по алгоритму задания 1 в лабораторной работе № 3.

Техника выполнения работы

1. Отбор проб и подготовка их к анализу.

Пробы готовой продукции (рыба целиком неразделанная, разделанная, куски, тушка, балычок и т.д.) отбираются после упаковки в тару из трех единиц транспортных упаковок (ящиков) общей массой не более 500 г. Если продукция находится в потребительской таре весом менее 500 г (полиэтиленовых мешках, коробочках, металлических или полимерных банках), то для анализа отбирается 1-2-3 ед. упаковки без нарушения ее целостности так, чтобы масса пробы не превышала 300 г. Перед анализом банку необходимо вымыть, просушить, металлическую – обжечь спиртом, полимерную - обтереть спиртом, полностью вскрыть, все содержимое измельчить.

Из крупной рыбы (1-3 шт.), рулетов, теши, боковника и т.д. вырезают поперечные куски массой не более 300 г. Для анализа продукцию горячего копчения измельчают вместе с кожей, а холодного – без кожи, в том и другом случаях не затрагивая кишечник. Перед снятием кожи с рыбы необходимо поверхность объекта протереть спиртом. Берут навеску 10 г и вносят в 90 см³ жидкости для разведений.

2. Определение количества МАФАнМ.

Методика определения КМАФАнМ дана в описании лабораторной работы № 2.

3. Определение бактерий группы кишечных палочек.

Методика представлена в лабораторной работе № 2.

4. Определение золотистых стафилококков.

Методика определения дана в описании лабораторной работы № 3.

5. Определение сульфитредуцирующих клостридий (сульфит-восстановителей).

Методика определения дана в описании лабораторной работы № 3.

6. Определение бактерий род сальмонелл.

Методика определения дана в описании лабораторной работы № 3.

Вопросы самоконтроля

1. Какое действие на микрофлору рыбы оказывают вещества, содержащиеся в копильном дыме?

2. Какие микроорганизмы сравнительно устойчивы к действию копильного дыма?

3. Какие еще факторы, влияющие на уничтожение жизнеспособности микрофлоры при горячем копчении, Вы знаете?

4. Какое влияние на качество копченой продукции оказывает степень свежести сырья?

5. Каков состав микрофлоры рыбы горячего и холодного копчения и каково ее происхождение?

6. Почему рыба горячего копчения портится быстрее, чем холодного?

7. Назовите наиболее распространенные виды порчи копченой продукции и меры предупреждения их.

8. Какой процесс именуют “влажное гниение”? Какие микроорганизмы вызывают этот процесс?

9. Каковы источники обсеменения рыбы микроорганизмами, вызывающими пищевые отравления?

10. Какие используют возможности для увеличения продолжительности сохранения качества копченой рыбы?

11. Почему копченую рыбу рекомендуют хранить в пленках ограниченной газопроницаемости, заполненных CO₂?

12. Какие точки санитарно-микробиологического контроля производства рыбы холодного копчения Вы знаете?
13. Как осуществляется отбор проб копченой продукции для анализа?
14. Какова масса продукта в которой не допускаются бактерии рода сальмонелл?
15. Какие дифференциально-диагностические среды используют для определения сальмонелл?
16. Каковы морфологические и культуральные признаки сальмонелл?
17. Как проводят изучение серологических свойств бактерий рода сальмонелл?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7

Тема: Санитарно-микробиологический контроль кулинарных изделий

Цель занятия: Ознакомиться с методами отбора проб, подготовки их к анализу, провести микробиологический контроль кулинарных изделий.

Санитарно-микробиологический контроль кулинарных изделий включает определение мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (в том числе плесеней и дрожжей), наличие бактерий группы кишечных палочек, *St. aureus*, патогенных, в том числе *Salmonella*, сульфитредуцирующих клостридий

Учитывая определенную специфичность в технологии приготовления, характере и уровне бактериальной обсемененности, все кулинарные изделия по способу кулинарной обработки и для удобства осуществления микробиологического контроля условно делятся на девять групп:

I - подвергнутые термической обработке (жареные, отварные, печеные, рулеты, шашлыки; из фарша – котлеты, рыба фаршированная, вареные колбасы, сосиски; с добавлением муки – пирожки и пельмени жареные, пирожки печеные, кулебяки, чебуреки, расстегаи, пироги, крабовые палочки, соломка, палочки во фритюре и др.; в различных заливках, в том числе в герметически укупоренной таре).

II- желированные продукты (студень, рыба заливная [и др.]).

III -рыбные пастообразные и измельченные слабосоленые продукты, в том числе масла (паштеты, сельдь рубленая, масло селечное, килечное, крилевое, икорное и др.).

IV - многокомпонентные (салаты, солянки, пловы, закуски, тушеные морепродукты с овощами и др.).

V - варено-мороженые: быстрозамороженные обеденные, закусочные блюда (солянки, рыба отварная, жареная под соусами, с гарниром и др.); фар-

шевые изделия (крабовые палочки, жареные рыбные палочки, котлеты, крокеты и др.); нерыбные объекты морского промысла (паста «Океан», мясо краба, криля и др).

VI - сырые замороженные полуфабрикаты (пельмени, рыбные крокеты [и др.], в том числе разделанная рыба и нерыбные объекты морского промысла – сырье).

VII- рыба разделанная слабосоленая, соленая с добавлением растительных масел, в разных, заливках, соусах, маринадах или без заливок с добавлением или без добавления гарниров, со специями и без них (филе пикантное, любительское, сочинское, закусочное, хамса в горчичном соусе, сельдь в соусах, рыба соленая в нарезку [и др.]), без консервантов в мелкой расфасовке.

VIII - икорные продукты (различные запеканки, хлебцы, икра минтая закусочная, крем икорный [и др.]).

IX - продукты, упакованные под вакуумом, готовые к употреблению

Таблица 8

Профилактический микробиологический контроль кулинарных изделий из рыбы и нерыбных объектов

Группа	Исследуемый продукт после упаковки	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускается		
			БГКП	КПС	патогенная микрофлора, в том числе сальмо- неллы
1	Подвергнутые термической обработке				
	Рыба разделанная	5·10 ³	1,0	1,0	25
	Рыба неразделанная	1·10 ⁴	1,0	1,0	25
	Рыба фаршированная, ру- леты, шашлыки, пель- мени жареные	2·10 ⁴	1,0	1,0	25
	В различных заливках (соусах, маринадах)	1·10 ⁴	1,0	-	25
	Фаршевые с добавлением муки	1·10 ³	1,0	1,0	25
2	Желированные				
	Студень	5·10 ³	0,1	1,0	25
	Рыба заливная	1·10 ⁴	0,1	1,0	25
3	Пастообразные				
	Паштеты, сельдь рублен- ная и т.п.	2·10 ⁵	0,01	0,1	25
	Масло (селедочное, кри- левое и т.п.)	-	0,001	0,1	25

4	Многокомпонентные				
	Не подвергнуты термической обработке после смешивания компонентов (салаты)	$5 \cdot 10^4$	0,01	-	-
	Повергнутые термообработке после смешивания компонентов (солянки, пловы, закуски, тушеные морепродукты с овощами)	$1 \cdot 10^4$	0,1	1,0	25
5	Варено-мороженные				
	Быстрозамороженные, обеденные, закусочные	$2 \cdot 10^4$	0,1	1,0	25
	Фаршевые изделия (крабовые палочки и др.)	$1 \cdot 10^3$	1,0	0,1	25
	Мясо антарктической креветки (криля), паста «Океан»	$5 \cdot 10^4$	1,0	1,0	25
	Мясо крабовое в мелкой расфасовке	$1 \cdot 10^3$	0,1	1,0	25
	Крабовая продукция в панцире	$5 \cdot 10^4$	1,0	1,0	25
6	Сырые замороженные полуфабрикаты	$5 \cdot 10^4$	-	-	25
7	Рыба разделанная, слабосоленая, соленая (в том числе лососевые без консервантов)				
	С растительным маслом, в заливках, без добавления гарнира, внарезку	$5 \cdot 10^4$	0,1	1,0	25
	Со специями (филе пикантное и др.)	$1 \cdot 10^5$	0,1	1,0	25

Задание 1. Отобрать пробы полуфабрикатов, готовых для кулинарной обработки и рыбных кулинарных изделий, подготовить их к анализу, выявить количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, наличие бактерий группы кишечных палочек (коли-формы), золотистых стафилококков, сальмонелл и сделать вывод о санитарно-микробиологическом состоянии готовой продукции.

Объект исследования:

отварная, жареная, печеная, заливная, фаршированная рыба; филе пикантное, любительское, сельдь в соусах, рыба соленая в нарезку; котлеты, тефтели, фрикадельки, колбасы, сосиски; пельмени, крабовые палочки, кулебяки, растегаи, пирожки с рыбным фаршем; пасты, паштеты; рыбное, икорное, креветочное масло; салаты, солянки, пловы; икорные продукты – запеканки, хлебцы; мясо краба, криля.

Материалы и оборудование:

колбы с 90 см³ стерильной воды, спирт; скальпель, металлическая лопатка, спиртовки, стерильные ступки с пестиком или измельчитель, стерильные пипетки на 1-2 см³, стерильные чашки Петри; весы на 0,5 кг, штативы, термостат.

Содержание работы

Работа выполняется по алгоритму задания 1 в лабораторной работе № 3.

Техника выполнения работы

1. Отбор проб и подготовка к анализу.

Сырье (нерыбные объекты промысла) и полуфабрикаты.

Нерыбные объекты морского промысла отбирают в количестве 3-10 шт. из разных мест исследуемой партии. Крупные экземпляры отбирают в количестве не более 3 шт. Пробы помещают во взвешенную стерильную колбу, вновь взвешивают и по разности весов устанавливают массу отобранной пробы. Затем наливают стерильную жидкость в таком количестве, чтобы получить разведение 1:10.

Образцы мороженных фаршевых изделий (мороженный фарш, паста «Океан»[и др.]) отбирают из трех брикетов (мест) по 2-3 кусочка из поверхностных слоев и внутренней части массой около 200 г в банку. Пробы перед анализом полностью размораживают при температуре 2-5 °С в той емкости, в которой были доставлены в лабораторию. Пасту «Океан» допускается размораживать в термостате при 35 °С.

Пробы рыбного фарша, приготовленного на производстве, отбирают из разных мест общей массой около 200 г.

Рыбная кулинария.

Общая масса отобранной пробы должна составлять около 300 г. Если масса продукта в потребительской таре находится в пределах, то берут одну единицу упаковки из попавших в выборку и используют ее содержимое для анализа. Если масса продукта в потребительской таре больше массы пробы (то есть более 300 г), берут часть содержимого упаковки из разных мест.

Пробы гомогенизируют или растирают и отвешивают навеску 10 г для получения десятикратных разведений.

При исследовании пастообразных продуктов, содержащих жир, используемую при приготовлении гомогената и разведений жидкость необходимо прогреть до 40 °С. Отобранную пробу тщательно перемешивают, отбирают 10 г в 90 см³ стерильной жидкости для приготовления разведений.

Колбасные изделия отбирают в количестве 1-3 экземпляров в зависимости от размеров в стерильную бумагу. Перед анализом поверхность изделий в оболочке протирают и фламбируют спиртом. Из 3 штук мелких колбасных изделий или одного крупного батона берут пробу без оболочки в количестве

не менее 300 г. Для этого вскрывают оболочку, продольно разрезают батон на две половины и, отступая от края примерно 5 см, из боковых и центральных частей половины батона вырезают куски.

2. Определение количества МАФАНМ.

Методика определения КМАФАнМ дана в описании лабораторной работы № 1.

3. Определение бактерий группы кишечных палочек.

Методика представлена в лабораторной работе № 2.

4. Определение золотистых стафилококков.

Методика определения дана в описании лабораторной работы № 3.

5. Определение бактерий рода сальмонелл.

Методика определения дана в описании лабораторной работы № 3.

Задание 2. Определить бактерии рода протеев в желированных продуктах.

Объект исследования:

рыба заливная, студень.

Материалы и оборудование:

стерильные пробирки с рыбопептонным бульоном, пробирки с рыбо- или мясopептонным агаром.

Содержание работы

Первое занятие – освоить методику исследования, сделать посевы в пробирки с рыбопептонным бульоном и поставить в термостат.

Второе занятие – для определения бактерий рода протеев сделать пересев из рыбопептонного бульона в свежескошенный рыбо- или мясopептонный агар, поставить в термостат.

Третье занятие – пробирки с посевами просмотреть, обращая внимание на образование ползущего вверх вуалеобразного налета с голубоватым оттенком.

Техника выполнения работы

Метод основан на способности бактерий рода протеев расти на питательных средах в виде ползучего вуалеобразного опалесцирующего налета с образованием гнилостного запаха.

1 г (1 см³) продукта высевают в рыбопептонный бульон. Посев помещают в термостат при температуре 37 °С. Через 20-24 ч для определения бактерий рода протеев 2 капли из рыбопептонного бульона вносят в конденсационную воду свежескошенного рыбо- или мясopептонного агара, не касаясь поверхности среды.

Засеянные пробирки (вертикально) помещают в термостат с температурой 37 °С. Через 18-24 ч посевы просматривают, обращая внимание на образование ползущего вверх вуалеобразного налета с голубоватым оттенком.

При проходящем свете заметно роение колонии, культура опалесцирует и издает неприятный гнилостный запах.

Задание 3. Произвести определение сульфитредуцирующих клостридий (сульфитвосстановителей) в продуктах упакованных под вакуумом.

Объект исследования:

кулинарные изделия, упакованные под вакуумом, готовые к употреблению.

Материалы и оборудование

содержание работы и методика определения сульфитредуцирующих клостридий дана в описании работы № 3.

Вопросы самоконтроля

1. Каков состав микрофлоры рыбного фарша?
2. Какое влияние на качество рыбного фарша оказывает степень свежести сырья?
3. Каков состав микрофлоры кулинарных изделий и каково ее происхождение?
4. Почему рыбный фарш, вареные рыбные колбасы и рыбные кулинарные изделия разрешается хранить только на холоде и в течение краткого времени?
5. Какие технологические процессы приводят к снижению количества микроорганизмов при производстве рыбных колбас?
6. Назовите типичные виды порчи вареных рыбных колбас.
7. Назовите микроорганизмы, встречающиеся на нерыбных объектах промысла и источники обсеменения их микроорганизмами.
8. На какие группы с учетом технологии приготовления и уровня бактериальной обсемененности разделяются кулинарные изделия?
9. Определение каких показателей включает в себя микробиологический контроль сырья и полуфабрикатов при производстве продукции из морских беспозвоночных?
10. В каких случаях проводится дополнительный микробиологический контроль и что при этом анализируется?
11. Какие меры применяют для снижения бактериальной обсемененности кулинарных изделий?
12. Каковы правила отбора проб рыбной кулинарии?
13. В каких кулинарных изделиях определяют бактерии рода протеев и сульфитредуцирующие клостридии?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8

Тема: Санитарно-микробиологический контроль консервов

Цель занятия: Ознакомиться с методами отбора проб, подготовки их к анализу и определением термофильных мезофильных бактерий, дрожжей и плесневых грибов.

Санитарно-микробиологический контроль консервов включает определение КМАФАнМ, клостридий, плесневых грибов и дрожжей.

Таблица 9

Микробиологический контроль готовых консервов

Микроорганизмы, выявляемые в консервах	Оценка промышленной стерильности
Спорообразующие мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы <i>Bacillus subtilis</i> Спорообразующие мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы <i>Bacillus cereus</i> (или) <i>Bacillus polymyxa</i> Мезофильные клостридии	Не более 11 клеток в 1 г продукта Отсутствие Выявленные мезофильные клостридии не должны относиться к <i>Cl. botulinum</i> (или) <i>Cl. perfringens</i> . В случае определения мезофильных клостридий их не должно быть больше 1 клетки в 1 г продукта Отсутствие
Неспорообразующие микроорганизмы и (или) плесневые грибы, и (или) дрожжи Спорообразующие термофильные анаэробные, аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы	При выявлении температура хранения консервов не должна быть выше 20 °С

Задание 1. Отобрать пробы, подготовить их к анализу, определить в них термофильные и мезофильные бактерии.

Оборудование и материалы:

теплая вода для мытья банок, мыло, вата, бюкс со спиртом, пробойник, стерильные трубочки, МПБ с 1 % глюкозы, 3 % раствор перекиси водорода, среда Китт-Тароцци, картофельно-пептонный бульон, индикатор бромкрезол пурпур, красители для окраски по методу Грама.

Содержание работы:

Первое занятие

1. Познакомиться с методами отбора проб.
2. Подготовить банку с консервами к анализу.
3. Вскрыть и отобрать пробы.

4. Сделать посеvy для определения термофильных и мезофильных аэробов и анаэробов в асептических условиях или в боксе.

5. Поместить посеvy в термостат.

Второе занятие

6. «Прочитать» (просмотреть) посеvy и сделать посеvy по II этапу.

Третье занятие

7. Просмотреть посеvy II этапа и сделать заключение о промышленной стерильности консервов.

Техника выполнения работы

1. Отбор проб и подготовка их к анализу.

Правила вскрытия банки

1) Вымыть банку теплой водой с мылом, обсушить ее.

2) Протереть стол и руки спиртом.

3) Поверхность банки протереть тампоном, смоченным спиртом, поместить его на крышку банки и зажечь.

4) Под горящий ватный тампон подвести стерильный пробойник и проколоть в крышке отверстие диаметром 1 - 1,5 см. Отверстие закрыть горящим ватным тампоном и крышкой стерильной чашки Петри.

Для взятия пробы консервов в отверстие вводят стерильную трубочку и набирают в нее и твердую часть, и заливку консервов.

2. Выявление мезофильных и аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов:

произвести посев трубочкой в две пробирки с РПБ + 1 % глюкозы по 2 см³ анализируемых консервов. На пробирках подписать все данные об анализе. Посев термостатировать 5 сут при температуре 37±0,5 °С, ежедневно наблюдая за появлением признаков роста микроорганизмов: помутнение среды, образование пленки, появление осадка.

Из пробирок с признаками роста микробов приготовить мазки и окрасить по Граму, микроскопировать с иммерсией при увеличении 90. В посевах, содержащих спорообразующую микрофлору, проверить наличие каталазы, для чего при помощи 10 %-ной едкой щелочи или 10 %-ной соляной кислоты довести реакцию питательной среды до нейтральной. Из пробирки взять 0,5 см³ культуральной жидкости и перенести на стерильное предметное стекло, добавив каплю 3 %-ного раствора перекиси водорода. Полученную смесь накрыть покровным стеклом. Если микроорганизмы образуют каталазу, то выделяются пузырьки газа; если в течение 3 мин пузырьки газа не появились, считается, что микроорганизмы каталазы не образуют.

Мезофильные бациллы из групп *Subtilis* - *Mesentericus* не образуют в среде газа, имеют форму палочек с центральными спорами, грамположительные, образуют каталазу.

3. Выявление мезофильных анаэробных микроорганизмов:

прогреть 25 мин на кипящей водяной бане две пробирки со средой Китт-Тароцци и сразу остудить. Произвести посев по $1,0 \pm 0,1$ см³ консервов в две пробирки с 12-13 см³ среды Китт-Тароцци, на пробирках подписать все данные об анализах, термостатировать при температуре 30 ± 1 °С в течение 5 сут, ежедневно проверяя появление признаков роста микроорганизмов. Развитие мезофильных анаэробных микроорганизмов сопровождается помутнением среды, выделением газа, появлением постороннего запаха, иногда разложением кусочков мяса или печени. В случае появления признаков роста из пробирок делают мазки и окрашивают по Граму. Материал для мазков берут пастеровской пипеткой со дна пробирки. Микроскопируют с иммерсионным маслом, объектив 90. В мазках облигатно-анаэробных мезофильных бактерий должны присутствовать грамположительные палочки со спорами. В посевах, содержащих подозрительную микрофлору, определяют наличие каталазы (см. выше). Мезофильные анаэробные микроорганизмы каталазы не образуют.

При подозрении на *Cl.perfringens* следует сделать посевы на среду Роберта, среды Гисса, с глюкозой, мальтозой, лактозой и маннитом, лакмусовое молоко, среду Вильсон-Блера. Если на среде Вильсон-Блера вырастают темно-серые и черные гладкие колонии, среда под которыми чернеет, в колониях обнаруживаются грамположительные, неподвижные палочки, образующие нитриты, каталазоотрицательные, ферментирующие глюкозу, лактозу, мальтозу, но не маннит, вызывающие бурую ферментацию молока, - делают заключение о наличии в консервах *Cl.perfringens*.

4. Выявление термофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов:

сделать посевы по 2 см³ исследуемых консервов в две пробирки с картофельно-пептонным бульоном, подписать на пробирках все данные об анализах. Термостатировать 72 ч при температуре $55 \pm 0,5$ °С.

Развитие термофильных аэробных бактерий сопровождается помутнением среды и иногда образованием пристенного кольца и легкой пленки. Из проросших сред сделать мазки, окрасить по Граму, микроскопировать с маслом при увеличении 90. Термофильные аэробы в мазках имеют форму палочек со спорами; каталазная реакция положительная.

Для определения способности бактерий образовывать кислоту к культуральной жидкости следует добавить одну каплю 0,04 %-ного раствора бромкрезолпурпура. Изменение цвета индикатора из сине-фиолетового в желтый говорит о способности исследуемых микроорганизмов образовывать кислоту.

5. Выявление термофильных анаэробных микроорганизмов:

прогреть 15 мин на кипящей водяной бане две пробирки с питательной средой Китт-Тароцци с углекислым кальцием, дрожжевым автолизатом и аскорбиновой кислотой. В пробирки посеять по 2 см³ исследуемых консервов,

на пробирках подписать данные об анализе, термостатировать посеvy 72 ч при температуре $55 \pm 0,5$ °C. Посевы просматривать ежедневно. Развитие термофильных анаэробов сопровождается помутнением среды и обильным газообразованием. Из пробирок с признаками роста микроорганизмов делают мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют с маслом, объектив 90. Термофильные анаэробы – тонкие, длинные, гранулированные палочки со спорами (иногда спор может и не быть), окраска по Граму переменчива. Если в мазках обнаружена подозрительная микрофлора, нужно сделать реакцию на каталазу. Термофильные анаэробные клостридии каталазы не образуют.

Задание 2. Определить в отобранных пробах дрожжевые и плесневые грибы.

Оборудование и материалы:

чашки Петри, среда Сабуро, стерильные трубки.

Содержание работы:

Первое занятие

1. Сделать посеvy для выявления дрожжей и плесневых грибов.
2. Поставить посеvy в термостат.

Второе занятие

3. «Прочитать» (просмотреть) посеvy и дать заключение о наличии в консервах дрожжей и плесневых грибов.

Техника выполнения работы

Взять 1 см³ пробы и засеять в чашки Петри, посеvy залить 15-30 см³ содового агаризованного суслу или средой Сабуро. Подписать на чашках данные об анализе. Термостатировать посеvy 5 сут при температуре $30 \pm 0,5$ °C. После термостатирования посмотреть чашки, отметить характерные колонии, промикроскопировать их и дать окончательное заключение о наличии в консервах дрожжевых или плесневых грибов.

Вопросы для самопроверки

1. К какой группе микроорганизмов относится микрофлора, вырастающая на ПА при 37 °C?
2. Какие виды микробиологического контроля существуют на рыбоконсервном производстве?
3. Каково назначение контроля на рыбоконсервном производстве?
4. Каковы правила отбора проб и доставки их в лабораторию?
5. В каких случаях производится бактериологическое исследование консервов?
6. Каковы методы определения аэробных бактерий в консервах?
7. Каковы методы определения анаэробных бактерий в консервах охлажденной рыбы и рыбы-сырца?

Рекомендуемая литература представлена в рабочей программе дисциплины²

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Отбор проб и подготовка их к анализам	5
Определение качества сырья бактериоскопическим методом	7
Определение качества сырья бактериологическим методом	8
Лабораторная работа № 1	40
Лабораторная работа № 2	45
Лабораторная работа № 3	49
Лабораторная работа № 4	59
Лабораторная работа № 5	62
Лабораторная работа № 6	64
Лабораторная работа № 7	68
Лабораторная работа № 8	74
Список литературы	78