

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
ФГБОУ ВПО «Красноярский государственный аграрный университет»

И.В. Боев

**МИКРОБИОЛОГИЯ СЫРЬЯ И ПРОДУКТОВ
РАСТИТЕЛЬНОГО И ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

*Методические указания
к лабораторным занятиям*

Красноярск 2015

Рецензент:

Машанов А.И., д-р биол. наук, проф., зав. каф. технологии консервирования и оборудования пищевых производств КрасГАУ

Боер, И.В.

Микробиология сырья и продуктов растительного происхождения: метод. указания к лабораторным занятиям / И.В. Боер; Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2015. – 32 с.

В методические указания в соответствии с рабочей программой дисциплины «Микробиология» (Модуль 3. Модульная единица 3.4. Микробиология сельскохозяйственной продукции и микробиологический контроль продуктов переработки) включены лабораторные работы.

Предназначено для студентов очного и заочного отделений, обучающихся по направлению подготовки 110900.62 «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции». Может быть использовано студентами, обучающимися по направлению 111900.62 «Ветеринарно-санитарная экспертиза».

Печатается по решению редакционно-издательского совета
Красноярского государственного аграрного университета

© Боер И.В., 2015

© ФГБОУ ВПО «Красноярский государственный аграрный университет», 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	4
Лабораторная работа №1. Микробиологический анализ молока...	5
Лабораторная работа №2. Микробиологический контроль качества лабораторных заквасок и кисломолочных продуктов....	10
Лабораторная работа №3. Микробиологическое исследование сыра и масла.....	17
Лабораторная работа №4. Микробиологический анализ мяса.....	20
Лабораторная работа №5. Микробиологический анализ яйца.....	23
Лабораторная работа №6. Микробиологическое исследование продуктов растительного происхождения, кормов, кормовых добавок.....	26
Литература.....	31

ВВЕДЕНИЕ

Методические указания к лабораторным занятиям «Микробиология сырья и продуктов растительного и животного происхождения» подготовлено в соответствии с перечнем лабораторных работ, включенных в рабочую программу дисциплины «Микробиология» (Модуль 3. Модульная единица 3.4. Микробиология сельскохозяйственной продукции и микробиологический контроль продуктов переработки), направление подготовки 111900.62 «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции».

В указаниях лаконично изложены основные приемы исследования сельскохозяйственной продукции и кормов, приводятся бактериологические и бактериоскопические методы исследования. Целью выполнения лабораторных работ является освоение методов исследования сельскохозяйственного сырья продукции и продуктов его переработки, приобретение навыков использования полученных результатов для оценки безопасности продукции по микробиологическим показателям.

Предназначено для студентов очной и заочной форм обучения. Может быть использовано студентами, обучающимися по направлению 111900.62 «Ветеринарно-санитарная экспертиза».

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

Микробиологический анализ молока

Цель: ознакомиться с бактериологическими методами исследования и научиться на основании полученных результатов давать оценку качества молока.

Вопросы для самоподготовки

1. Какие фазы развития микроорганизмов в сыром молоке вы знаете?
2. Какие вещества, содержащиеся в молоке, обеспечивают бактерицидную фазу?
3. Чем характеризуется фаза развития смешанной микрофлоры?
4. Для чего проводят пастеризацию молока?
5. Какие источники попадания маслянокислых бактерий в молоко вы знаете?
6. Какие источники попадания в молоко бактерий группы кишечной палочки (БГКП) вы знаете?

Исследование молока проводится в плановом порядке при:

- 1) внутризаводском контроле по ходу технологического процесса;
- 2) выпуске продукции с предприятия, перерабатывающего молоко;
- 3) контроле соблюдения правил хранения и реализации;
- 4) по эпидемическим показаниям.

Задание. В предлагаемых образцах (сырое – образец 1 или пастеризованное – образец 2) молока определить:

- ✓ общее количество микроорганизмов;
- ✓ коли-титр;
- ✓ количество молочнокислых бактерий;
- ✓ наличие маслянокислых бактерий.

Отбор проб молока или сливок осуществляется стерильным пробоотборником или черпаком в стерильную колбу с пробкой по 50 мл каждая. Допускается хранение пробы при температуре 5–6⁰С до 4 часов с момента отбора.

Определение общего количества микроорганизмов

Ход работы. В основу количественного учета микроорганизмов, содержащихся в молоке, для оценки его качества положен метод предельных (последовательных) разведений. Для этого из колбы с 50 мл исследуемой пробы 1 мл стерильной пипеткой переносят в пробирку с 9 мл стерильной воды и готовят следующие разведения: 1:10, 1:100, 1:1000 – для пастеризованного молока, 1:10, 1:100, 1:1000; 1:10000. 1:100000 – сырого.

Из каждого разведения по 1 мл стерильной пипеткой переносят в стерильную чашку Петри (рис. 1), образец 1 – пастеризованное молоко – высев из трех первых разведений, образец 2 – сырое молоко – высев из пяти разведений.

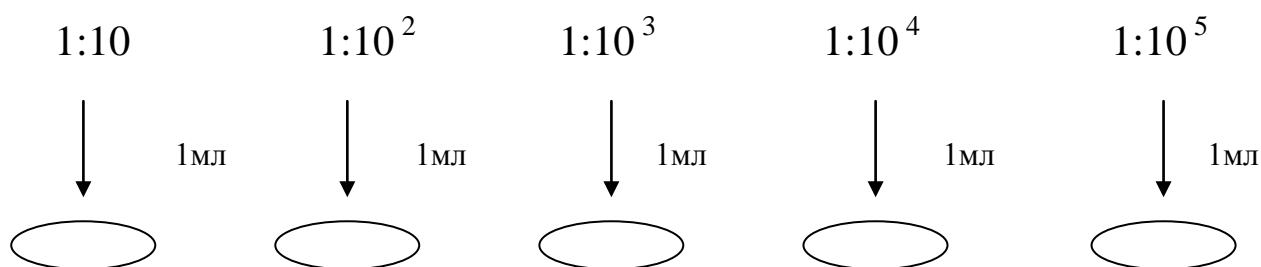


Рисунок 1 – Схема посева разведений в чашке Петри

Заливают расплавленным и охлажденным до 45°C МПА аккуратно, покачивая чашку для равномерного распределения посевного материала, перемешивают. Инкубируют при температуре 37°C в течение двух суток.

Учет. Для работы отбирают чашки, на которых вырастает от 50 до 250 колоний. Количество колоний подсчитывают на темном фоне. Число колоний, выросших на каждой чашке, умножают на соответствующее разведение, из которого сделан посев. При параллельном высеве в нескольких чашках подсчитывают среднее арифметическое значение.

Количественный учет молочнокислых бактерий чашечным методом

Количественный учет молочнокислых бактерий проводят аналогичным образом, описанным выше.

Из каждого разведения по 1 мл суспензии переносят стерильной пипеткой в стерильную чашку Петри и заливают расплавленной и охлажденной агаризованной капустной средой для молочнокислых бактерий с мелом. Инкубируют при температуре 30°C в течение 72 часов.

Учет. Колонии молочнокислых бактерий распознают по зонам просветления, которые образуются в результате растворения мела молочной кислотой, продуцируемой этими микроорганизмами. Подсчитывают колониобразующие единицы (КОЕ) молочнокислых бактерий в 1 мл молока.

Определение коли-титра молока

Коли-титр – наименьшее количество исследуемого продукта, в котором устанавливается наличие кишечной палочки (*Escherichia coli*).

Коли-титр характеризует санитарно-гигиенический режим получения и обработки молока, условия содержания лактирующих коров.

В молоке и сливках определяют *бродильный титр* – наименьшее количество, в котором присутствует хотя бы одна клетка бактерий группы кишечной палочки (БГКП). Титр кишечной палочки определяется методом бродильных проб.

Первая бродильная проба: в шесть пробирок со средой Кесслера засевают молоко: в три пробирки по 1 мл; в три пробирки по 0,1 мл.

Учет. Просматривают пробирки. Пузырьки газа свидетельствуют о возможном загрязнении молока *E.coli*. Для подтверждения ставят вторую бродильную пробу.

Вторая бродильная проба: из пробирок, в которых обнаружены пузырьки газа, делают посев бактериологической петлей в чашку Петри с элективной средой Эндо. Посев инкубируют при температуре 37°C в течение 18–24 часов.

Учет. При обнаружении на среде Эндо красных с металлическим блеском или розовых слизистых колоний их изучают выборочно (окрашивают по Граму, ставят оксидазный тест). Для грамотрицательных и оксидазоотрицательных палочек ставят *третью бродильную пробу* с глюкозой.

Коли-титр пастеризованного молока и сливок устанавливают следующим образом (табл. 1):

1) коли-титр более 3 – ни в одной пробирке нет газообразования;

2) коли-титр равен 3 – в одной из трех пробирок, засеянных 1 мл молока, есть газообразование;

3) коли-титр равен 0,3 – брожение обнаружено более чем в одной пробирке с 1 мл или хотя бы в одной из пробирок с 0,1 молока.

Таблица 1 – **Определение коли-титра**

Вариант	Наличие кишечной палочки в 1 мл продукта						Коли-титр
	1,0	1,0	1,0	0,1	0,1	0,1	
1	–	–	–	–	–	–	> 3,0
2	+	–	–	–	–	–	3,0
3	+	+	–	–	–	–	< 3,0 >0,3
4	+	+	+	–	–	–	> 0,3
5	+	+	+	+	–	–	0,3
6	+	+	+	+	+	–	< 0,3

Примечание: (+) – E.coli присутствует; (–) – E.coli отсутствует.

Определение титра маслянокислых бактерий

Из каждого разведения исследуемого образца молока по 1 мл засевают в пробирки со стерильным молоком (в качестве питательной среды). Засеянные пробирки нагревают в водяной бане при температуре 85°C в течение 10 мин.

Инкубируют в термостате при температуре 30°C в течение трех дней (72 часа).

Учет. Наличие маслянокислых бактерий определяют по образованию газа, запаху масляной кислоты. Из таких пробирок готовят мазок «раздавленная капля». На предметное стекло помещают 1 каплю содержимого исследуемой пробирки, добавляют раствор Люголя (раствор йода в йодистом калии) накрывают покровным стеклом, микроскопируют с масляной иммерсией.

Маслянокислые бактерии – это подвижные, спорообразующие, неправильной формы клетки (кlostридии или плектридии), в

которых гранулеза – запасное питательное вещество – окрашивается раствором йода в йодистом калии в фиолетовый цвет.

Титром маслянокислых бактерий считают то наибольшее разведение молока, в котором обнаруживается рост маслянокислых бактерий.

Результаты исследований оформляют в виде таблицы 2 и делают вывод о микроорганизмах, содержащихся в сыром и пастеризованном молоке.

Таблица 2 – Сравнительный анализ качества исследованных образцов молока

Исследуемый образец	КОЕ, в 1 мл на МПА	КОЕ молочнокислых бактерий, в 1 мл	Коли-титр	Титр маслянокислых бактерий
Молоко: – сырое – пастеризованное				

Оценка качества молока в зависимости от общего количества микроорганизмов (в 1 мл):

- 1) до 300 тыс. КОЕ в 1 мл – высшее;
- 2) 300–500 тыс. КОЕ в 1 мл – хорошее;
- 3) от 500 тыс. до 4 млн – удовлетворительное;
- 4) от 4 млн до 20 млн – плохое;
- 5) свыше 20 млн – очень плохое.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

Микробиологический контроль качества лабораторных заквасок и кисломолочных продуктов

Цель: ознакомление со схемой контроля качества заквасок, изучение микрофлоры кисломолочных продуктов и оценка их качества.

Вопросы для самоподготовки

1. Что такое производственные штаммы молочнокислых бактерий?
2. Что такое гомоферментативное молочнокислое брожение? При изготовлении каких кисломолочных продуктов используют этот тип брожения?
3. Каких возбудителей и конечные продукты гомоферментативного брожения вы знаете?
4. Что такое гетероферментативное брожение? При изготовлении каких кисломолочных продуктов используют этот тип брожения?
5. Что такое бифидоброжение? Каких возбудителей брожения вы знаете?

Для приготовления молочнокислых продуктов используют закваски, состоящие из чистых культур молочнокислых стрептококков (табл. 3) и молочнокислых палочек (табл. 4).

Высококачественные закваски характеризуются:

- ✓ отсутствием посторонней микрофлоры;
- ✓ активностью закваски, которая определяется по времени сквашивания молока;
- ✓ способностью образовывать диацетил и ацетоин – вещества, которые создают аромат молочнокислых продуктов;
- ✓ способностью продуцировать CO_2 .

Аналізу подвергаются жидкие и сухие закваски, из которых готовят фиксированные препараты, окрашивают метиленовым синим 3–5 минут. При микроскопии просматривают 10 полей зрения. В препарате закваски хорошего качества отсутствуют скопления клеток молочнокислых бактерий и посторонние микроорганизмы.

Посторонней микрофлорой для заквасок являются: БГКП

(*E. coli*), спорообразующие аэробные и анаэробные бактерии, дрожжи, микроскопические грибы. При обнаружении в микроскопических препаратах посторонней микрофлоры, ее идентифицируют в следующем порядке:

1. 3 мл закваски переносят в 20 мл среды Кесслера для определения коли-титра по схеме, описанной в лабораторной работе 1.

2. Для определения наличия спорообразующих бактерий по 1 мл закваски помещают в 2 пробирки с 20 мл стерильного молока и одну из пробирок заливают слоем парафина. Обе пробирки выдерживают в водяной бане при 85°C 10 минут. Затем культивируют в термостате при 30°C двое суток.

Учет. В присутствии анаэробных спорообразующих бактерий парафиновая пробка поднимается, молоко пептонизируется. Из содержимого пробирок готовят препараты, окрашивают метиленовым синим 3–5 минут и при микроскопии обнаруживают спорообразующие палочки.

3. Дрожжи и микроскопические грибы определяют высевом на чашки Петри с сусло-агаром.

Таблица 3 – Характеристика молочнокислых стрептококков

Стрептококки	Морфология	Колония	Температура, °С		Пределная кислотность, °Т	Характер сгустка	Вкус	Консистенция
			Оптимальная	Пределная				
<i>Streptococcus lactis</i>	Диплококки, короткие палочки	Каплевидная блестящая, беловатая, 1–2 мм	30–35	10–40	120 рН 4,0–4,5	Ровный	Кислый	Колющаяся
<i>Streptococcus cremoris</i>	Цепочки		25	10–36	110–115 рН 4,0–4,5	Ровный	Кислый	Сметанообразная
<i>Streptococcus diacetylactis</i>	Цепочки		25–30	10–36	80–100	Ровный, плотный иногда рваный	Слабокислый	Колющаяся
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Цепочки		40–45	10–55	110–115	Ровный, плотный	Слабокислый	Колющаяся

Таблица 4 – Характеристика молочнокислых палочек

Молочнокислые палочки	Морфология	Колония	Температура, °С		Предельная кислотность, °Т
			оптимальная	предельная	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Крупные палочки с закругленными концами, часто в виде цепочек 2–20 мкм	Поверхностные – волнистые; глубинные – в виде кусочков ваты	40–45	22–53	200
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Палочки различной длины, одиночные или в виде цепочек 1,5–6 мкм	Мелкие, гладкие, бесцветные	37	20–48	200–250
<i>Lactobacillus casei</i>	Палочки разной длины в виде отдельных и двойных клеток	Поверхностные – круглые; глубинные – лодочковидные, иногда с выростом	30	15–38	80–100

Активность закваски

Определяется временем свертывания пастеризованного или кипяченого молока при внесении в него 5-процентной закваски: 1 мл (г) закваски вносят в 20 мл молока.

Время свертывания молока закваской хорошего качества:

- ✓ не более 6 часов – для молочнокислых палочек;
- ✓ не более 7 часов – для молочнокислых стрептококков.

Определение ацетона и диацетила

Закваску фильтруют. В фарфоровую чашку вносят 3 капли фильтрата и 3 капли 40-процентного раствора КОН. Появление розового окрашивания через 10–15 минут свидетельствует о наличии ацетона и диацетила. Окрашивание через 30 минут не учитывается, если в закваске есть *E.coli*, метод не эффективен.

Определение CO₂

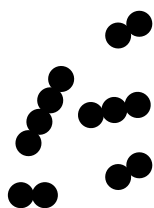
Пробирку с 2 мл хорошо перемешанной закваски, предварительно сделав отметку уровня закваски в пробирке, помещают в баню с холодной водой. Температуру воды в бане доводят до 90°C и, не вынимая пробирки, отмечают уровень поднятия сгустка.

Если в закваске есть CO₂, сгусток становится рубчатым и поднимается над сывороткой на 0,6–3,0 см и больше, что указывает на присутствие в закваске *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus paracitovorius*.

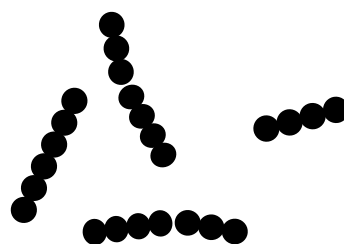
Исследование кисломолочных продуктов, приготовленных на заквасках мезофильных молочнокислых бактерий

Обыкновенная простокваша. Готовая простокваша имеет ровный сгусток слабокислый вкус [85–110°Т].

Для микробиологического исследования бактериологической петлей делают мазок из простокваши, высушивают, фиксируют и окрашивают метиленовым синим 3–5 минут. Обнаруживают клетки молочнокислых стрептококков (рис. 2).



Streptococcus lactis



Streptococcus cremoris

Рисунок 2 – Молочнокислые стрептококки

Сметана и творог. Для приготовления этих продуктов используют те же микроорганизмы, что и в случае простокваши, – *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*.

Однако для сметаны берут расы *Streptococcus lactis*, образующие вязкую консистенцию, а для творога применяют расы, которые образуют ровный плотный сгусток при сквашивании молока.

Если на препаратах указанных кисломолочных продуктов встречаются посторонние микроорганизмы: дрожжи, плесневые грибы – это свидетельствует о порче продукта.

Препарат готовят как в случае исследования обыкновенной простокваши.

Кефир. Для приготовления кефира используют кефирные грибки, представляющие собой симбиоз: молочнокислые палочки, «палочка стромы», близкая по свойствам к *Lactobacillus caucasicus (brevis)*, различные виды дрожжей, молочнокислый стрептококк, уксуснокислые бактерии.

Готовят фиксированный мазок, окрашивают метиленовым синим, микроскопируют с масляной иммерсией.

В мазках из доброкачественного кефира обнаруживают:

- ✓ молочнокислые стрептококки – 94–99 %;
- ✓ палочки – 4–5 %;
- ✓ дрожжи – 1 %.

В выдержанном кефире обнаруживают:

- ✓ молочнокислые стрептококки – 50–60 %;
- ✓ молочнокислые палочки – 10 %;
- ✓ дрожжи – 10 %.

Исследование кисломолочных продуктов, приготовленных на заквасках термофильных молочнокислых бактерий (рис. 3)

Ацидофильная простокваша. Для приготовления используют *Streptococcus termophilus* and *Lactobacillus acidophilus*.

Ацидофильное молоко отличается от ацидофильной простокваши тем, что его микрофлора состоит только из *Lactobacillus acidophilus*.

Ацидофилин. Для приготовления используют *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus lactis* и кефирную закваску.

Для микроскопического исследования любого вышеперечисленного продукта готовят фиксированный препарат, окрашивают метиленовым синим 3–5 мин и микроскопируют с масляной иммерсией.

В мазках отмечается специфическая микрофлора, а в мазках ацидофильной простокваши *Streptococcus termophilus* должно быть в 2 раза больше, чем *Lactobacillus acidophilus*.



Рисунок 3 – Термофильные молочнокислые палочки

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

Микробиологическое исследование сыра и масла

Цель: ознакомиться с методами исследования сыра и молока, используемого в сыроделии, масла. По результатам микробиологического анализа определить качество масла, сыра.

Вопросы для самоподготовки

1. Какие микроорганизмы используют для приготовления закваски в сыроделии?
2. Какие пробы используют для определения пригодности молока для производства сыра?
3. Для чего в сыроделии используются пропионовокислые бактерии?
4. Какие микроскопические грибы используют в сыроделии для создания пикантного вкуса и рисунка сыра?
5. Как по микроскопической картине отличить свежеприготовленное и старое масло?

При приготовлении сыров используют закваски, содержащие:

Streptococcus lactis	
Streptococcus cremoris	Для сыров с низкой
Streptococcus diacetylactis	температурой второго нагрева
Streptococcus paracitovorus	
Streptococcus thermophilus	
Streptococcus lactis	Для советского и швейцарского
Streptococcus cremoris	сыров

Для получения характерного рисунка сыров типа швейцарского применяют закваски пропионовокислых бактерий *Propionibacterium aciidipropionici*. При производстве сыра рокфор используют микроскопический гриб *Penicillium ragueforti*, который в виде сухого порошка плесени распыляют или в виде суспензий разбрызгивают над поверхностью сыров.

Для микробиологического исследования сыров готовят мазок – отпечаток: тонкий кусочек сыра сдавливают между двумя

предметными стеками, оставшийся на них мазок фиксируют спиртом 96°C, обезжиривают эфиром и окрашивают метиленовым синим. Микроскопируют и зарисовывают микроскопическую картину. В мазках не должно быть спорообразующих маслянокислых бактерий в виде барабанных палочек и веретена, дрожжей, маммококков, вызывающих пептонизацию казеина и образование горьких пептидов.

В случае проведения полного микробиологического анализа пробы сыра берут стерильным щупом, которой вводят в середину куска, предварительно прижигая раскаленным шпателем выбранный участок поверхности. Из щупа берут 10 г сыра, 1 г растирают в стерильной ступке с 10 мл стерильной вода, подогретой до 45°C, а затем готовят последующие разведения.

Посевы производят следующим образом:

- ✓ из 1, 2, 3, 4 разведения на среду Кесслер для выделения БГКП,
- ✓ из 2, 3, 4, 5 разведения на стерильное обезжиренное молоко для выделения маслянокислых бактерий,
- ✓ из 1, 2, 3, 4 разведения на среду Сабуро или сусло-агар для выделения дрожжей,
- ✓ из 4 и 5 разведения на молочный агар для выделения маммококков.

Схемы и последовательность посевов приведены в лабораторной работе № 1.

Для определения качественного состава молока, используемого в сыроделия, применяют следующие виды проб: пробу на брожение; сычужно-бродильную пробу, позволяющую по характеру сгустка судить о присутствии различных групп микробов в молоке.

Указанные пробы применяют для определения пригодности молока для сыроделия.

Проба на брожение

25 мл молока заливают в стерильные пробирки, которые помещают в водяную баню при 38°C. Наблюдение проводят через 12 и 24 часа по следующим признакам: время свертывания, запах, вкус, кислотность в °Т (градусы Тернера).

По истечении 24 часов дают окончательную оценку.

Молоко считается доброкачественным, если свертывание его начинается по истечении 12 часов.

Сычужно-бродильная проба

В пробирку с 30 мл молока вносят сычужный фермент (0,5 готового сычужного порошка в 100 мл теплой воды), перемешивают и выдерживают 12 часов при 38–40°C.

Доброкачественное молоко свертывается в течение 20 мин, а через 12 часов дает совершенно однородный плотный сгусток с прозрачной сывороткой. По истечении 12 часов дают оценку молоку.

Микрофлора масла

Для микробиологического исследования масло нагревают в центрифужной пробирке на водяной бане при температуре 70°C. Затем центрифугируют 10 мин при 1500 об/ми. Верхний слой масла и белки сбивают, а из осадка готовят мазки.

Мазки фиксируют смесью спирта и эфира (1:1), окрашивают по Граму и микроскопируют с использованием иммерсионного объектива.

В мазках свежеприготовленного масла обнаруживаются молочнокислые стрептококки; в мазках из старого – молочнокислые стрептококки, дрожжи и микроскопические грибы.

Микрофлора кисломолочного масла зависит от технологии его приготовления и свежести:

Свежее масло содержит 10–100 млн КОЕ в 1 г, микроорганизмы представлены в основном молочнокислыми бактериями.

При хранении масла, приготовленного методом краткого сквашивания, в 1 г наряду с молочнокислыми бактериями содержится 5–10 млн КОЕ посторонней микрофлоры.

Сладко-сливочное масло содержит несколько тысяч клеток посторонних микроорганизмов в 1 г.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

Микробиологический анализ мяса

Цель: знакомство с микроорганизмами мяса, определение по микробиологическим показателям качества предложенных образцов мяса.

Вопросы для самоподготовки

1. Дайте сравнительный анализ микроорганизмов мяса от здорового скота, павших больных и переутомленных животных.
2. Каковы факторы, определяющие проникновение микроорганизмов вглубь мяса при его созревании?
3. Какие микроорганизмы преобладают в гниющем мясе?
4. Как приготовить препарат из мяса?
5. Как определить наличие анаэробов в мясе?

Мясо от здоровых животных практически не содержит микроорганизмов. В мясе от утомленных и павших животных содержатся аэробные (*Bac. subtilis*, *Bac. mycoides*, *Bac. mesentericus*), факультативно-анаэробные (*Proteus vulgaris*) и анаэробные микроорганизмы (*Cl. perfringens*, *Cl. putrificus*, *Cl. sporogenes*).

Проникновению внутрь мяса микроорганизмов, попавших на его поверхность, препятствует образующая корочка подсыхания, и при хорошей корочке туша может храниться до 8 недель при 0°C. Период созревания мяса (сложных физико-химических процессов, возникающих под воздействием ферментов) характеризуется распадом гликогена, образованием молочной и фосфорной кислоты. Созревшее мясо приобретает рыхлую консистенцию, особый вкус, аромат. В дальнейшем в нем при определенном температурном режиме начинаются микробиологические процессы, вызывающие гниение, образование пигментных пятен, свечение, кислотное брожение и т.д. (в мясо, охлажденное до 2–4°C, бактерии проникают за 30 дней на глубину 1 см).

Стадии гнилостного распада:

- ✓ на поверхности мяса появляются гнилостные кокки (образуется слизистый налет);
- ✓ наряду с кокками развиваются и становятся преобладающими *E. coli* (кишечная палочка), флуоресцирующие бактерии и спорообразующие;

✓ через 3–4 дня начинают развиваться анаэробы.

Иногда в мясе здоровых животных обнаруживаются болезнетворные микроорганизмы (салмонеллы, протей, кишечная палочка, золотистый стафилококк, *Cl. botulinum*), попадающие из содержимого кишечника или из других источников.

В случае убоя животных, больных сибирской язвой, туберкулезом, бруцеллезом, рожей свиней и другими инфекционными заболеваниями, микроорганизмы-возбудители, безусловно, содержатся в мясе. Использование такого мяса регулируется особыми ветеринарными правилами.

По степени свежести мясо подразделяют на:

✓ *доброкачественное* (имеет сухую корочку подсыхания бледно-розового или бледно-красного цвета, на разрезе – плотное эластичное, ямка после надавливания быстро исчезает);

✓ *сомнительной свежести* (покрыто плотной темно-красной или ослизненной корочкой, консистенция – мягкая, несколько дряблая, образующаяся при надавливании пальцем ямка не заполняется, запах неприятный с гнилостным оттенком; используется по указанию ветеринарно-санитарного надзора);

✓ *непригодное в пищу* (поверхность ослизненная, липкая, на разрезе мясо зеленого цвета, консистенция – дряблая, мажущаяся, жир слизистый с прогорклым запахом; такое мясо бракуется).

Микроскопирование мяса. Для микробиологического анализа берут два образца мяса (свежее и несвежее) и готовят мазки-отпечатки:

1) из поверхностного слоя мяса – стерильными ножницами вырезают кусочек 0,5–1 г и прикладывают срезанной стороной к поверхности профламбированного, обезжиренного стекла;

2) из глубоких слоев – поверхность мяса прижигают, стерильным ножом делают надрез и берут из глубины кусочек (0,5–1 г), который прикладывают к профламбированному стеклу.

Препараты высушивают на воздухе, фиксируют смесью спирта и эфира, окрашивают фуксином и микроскопируют. Подсчитывают количество микроорганизмов в каждом поле зрения, отмечают их форму и сведения заносят в таблицу 5, дают микробиологическую оценку качества мяса.

Таблица 5 – Оценка качества мяса по микробиологическим показателям

Органолептическая оценка мяса	Количество микроорганизмов в одном поле зрения		Наличие анаэробов в мясе	Оценка качества мяса
	кокки	палочки		

Свежее мясо. Препарат-отпечаток обычно окрашивается плохо. В мазках:

- 1) из поверхностного слоя – единичные палочки и кокки;
- 2) из глубоких слоев – или отсутствуют, или встречаются не во всех полях зрения.

Мясо подозрительной свежести. Препарат-отпечаток окрашивается удовлетворительно. В мазках из поверхностного и глубинного слоев – несколько десятков микроорганизмов, причем в последнем, – меньше.

Испорченное мясо. Препарат-отпечаток окрашивается хорошо. В поле зрения обоих препаратов более 30 микробных клеток.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5

Микробиологический анализ яйца

Цель: определить качество яйца на основании микробиологического анализа общего количества бактерий на скорлупе, в желтке и белке.

Вопросы для самоподготовки

1. Какие показатели обеспечивают отсутствие микроорганизмов в содержимом свежеснесенных яиц здоровой птицы?
2. Какие микроорганизмы вызывают порчу яйца (процесс аммонификации белковых веществ)?
3. При каких условиях в яйце начинают развиваться плесневые грибы?
4. Как выглядит яйцо, если оно поражено плесневыми грибами?
5. Присутствие какого микроорганизма указывает на нарушение санитарных требований и указывает на необходимость проведения дополнительного бактериологического исследования? На какие группы микроорганизмов?
6. Каким образом определяют коли-титр в белке и желтке яиц?

В содержимом свежеснесенных яиц здоровой птицы не содержатся микроорганизмы. Длительная сохранность яиц стерильными обусловлена наличием в его белке следующих веществ: лизоцима, овидина, кональбумина, овомукоида, овомуцина и углекислоты, подавляющих или задерживающих рост микроорганизмов. Кроме того, защитными свойствами в отношении микроорганизмов обладают яичные скорлупа, оболочки и рН – 9,2.

Источниками микроорганизмов, вызывающих порчу яиц, являются помет, руки работников птицефермы, воздух и т.д. Микроорганизмы, вызывающие порчу яиц, наиболее часто представлены:

- ✓ *Pseudomonas*, в том числе *Ps. fluorescens* (белок окрашивается в зеленые тона, ощущается гнилостный запах).
- ✓ *Proteus vulgaris* (содержимое яйца становится серым, затем черным; в яйце накапливается H₂S).
- ✓ *Micrococcus roseus* и *Staphylococcus aureus* (вызывают разжижение желтка, помутнение, водянистость белка и образование в

нем флуоресцирующего зеленого пигмента; возможен разрыв скорлупы);

✓ *Escherichia coli* (вызывает гнилостный распад яйца).

✓ *Плесневые грибы* (точечные пятна на скорлупе желтого, голубого, темно-зеленого и черного цвета, при проникновении гифы гриба в белок разрушается желточная оболочка, содержимое яйца перемешивается в виде полужидкой массы, яйца приобретают плесневелый запах).

Определение общего количества микроорганизмов и Escherichia coli на скорлупе, в желтке и белке

Постановка опыта. Для исследования необходимо два яйца (одно – свежее, другое – хранившееся в неблагоприятных условиях).

Микробиологическое исследование скорлупы. Яйцо помещают в стерильную чашку Петри и, аккуратно вращая его, готовят смыв, используя 10 мл стерильной водопроводной воды. Получают исходное (1-е) разведение, затем 1 мл смыва переносят в пробирку с 9 мл стерильной водопроводной воды (2-е разведение), из 2-го разведения 1 мл во вторую пробирку (3-е разведение), из 3-го – в третью (4-е разведение). По 1 мл из смыва, 2, 3 и 4-е разведения высевают в чашки Петри с МПА глубинным методом.

Микробиологический анализ белка и желтка. Скорлупу обтирают ватой, смоченной спиртом, затем фламбированным пинцетом осторожно разбивают скорлупу, из получившегося небольшого отверстия выливают в стерильную чашку Петри сначала белок, затем в другую чашку – желток. После этого готовят разведения белка и желтка (по 4 разведения в каждом случае) как было описано выше. Подготовленные 2, 3 и 4-е разведения белка и желтка высевают глубинным методом на чашки Петри с МПА.

Определение Escherichia coli. Для выявления кишечной палочки (индикатора фекального загрязнения) и определения ее титра в белке, желтке и смыве со скорлупы используют 1, 2, 3 и 4-е разведения. Посев (по 1 мл) производят на среду Булира, разлитую в пробирки по 9 мл, следующего состава (г/л):

✓ мясо-пептонный бульон – 1,5;

✓ маннит – 10,5;

✓ NaCl – 5, рН 7,0, режим стерилизации – 1 атм.

Пробирки с посевом выдерживают 48 часов при 42°C, далее из пробирок с забродившей жидкостью делают посевы на среду Эндо. Выделение на этой среде ярко-красных колоний и положительная бродильная проба позволяют считать установленным наличие в исследуемом субстрате кишечной палочки *Escherichia coli*.

Результаты опыта регистрируют в виде таблицы 6.

Таблица 6 – Оценка качества яйца по микробиологическим показателям

Показатель	Белок		Желток		Скорлупа	
	свежий	несвежий	свежий	несвежий	свежий	несвежий
<i>Escherichia coli</i> .						
Общее количество микроорганизмов						

Отбирают для подсчета то разведение, в котором количество колоний на чашке не менее 20 и не более 200, подсчитывают все колонии (крупные и мелкие) делают пересчет на все содержимое яйца (отдельно белка, желтка, скорлупы), дают заключение о качестве яйца.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6

Микробиологическое исследование продуктов растительного происхождения, кормов, кормовых добавок

Цель: ознакомиться с методами микробиологического исследования продуктов растительного происхождения, кормов, кормовых добавок, биологически активных препаратов.

Вопросы для самоподготовки

1. Что такое эпифитные микроорганизмы?
2. Что является источником формирования эпифитной микрофлоры?
3. Что является источником питания для эпифитных микроорганизмов?
4. Каково значение эпифитных микроорганизмов в жизни высших растений?
5. Чем обусловлена порча зерна при хранении во влажных условиях?
6. Как с помощью микробиологического анализа дать оценку качества зерна?
7. Какой метод положен в основу выделения эпифитных микроорганизмов. В чем он заключается?
8. Какой микробиологический процесс лежит в основе силосования кормов? Роль эпифитных микроорганизмов силосуемых растений при заготовке силоса?

Свежие и сухие плоды, овощи, ягоды играют важную роль в питании человека, следовательно, как на этапе их заготовки, так и переработки и хранения предусматривается санитарно-гигиенический контроль их качества. Свежие и сухие плоды, овощи, ягоды подвержены многим микробным заболеваниям, которые возникают в поле и могут проявиться в разные периоды хранения.

Микробиологический анализ сырья и продуктов растительного происхождения

Овощи, фрукты, ягоды, грибы, продукты их переработки, специи анализируют по следующим показателям:

- ✓ КМАФАнМ,
- ✓ БГКП (коли-формы),
- ✓ патогенные, в том числе *Salmonella*,
- ✓ дрожжи и плесневые грибы,
- ✓ *Bacillus cereus*.

Корма и кормовые добавки для животных классифицируются следующим образом:

- сочные (зеленые корма, силос, сенаж, корне- и клубнеплоды и бахчевые культуры);
- грубые (сено, солома, отходы растениеводства и веточный корм, искусственно высушенные корма);
- корма микробиологического происхождения (кормовые дрожжи, микробный белок (БВК, паприн, меприн-Д), аминокислоты);
- кормовые добавки (ферментные препараты, кормовые антибиотики).

Ход работы. Навеску фуражного зерна массой 5 г помещают в колбу с 50 мл стерильной водопроводной воды. Взбалтывают колбу 10 минут. Из полученной вытяжки готовят последовательные разведения (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). Затем делают высеv в стерильные чашки Петри, по капле из каждого разведения в пяти повторностях. Чашки инкубируют при температуре 30°C. Учет проводят через 5–7 дней.

Подсчитывают для каждого образца число колониеобразующих единиц (КОЕ) одновременно на 5-ти чашках и пересчитывают на 1 г зерна по формуле:

$$A = \frac{b \times v \times g}{d},$$

- где а – количество КОЕ в 1 г сырого образца;
 б – среднее количество КОЕ на одной чашке;
 в – разведение, из которого сделан посев;
 г – количество капель в 1 мл;
 д – вес анализируемого образца.



Для определения качественного состава микрофлоры зерна (зернопродуктов) колонии группируют по культуральным признакам, данные заносят в таблицу 7.

Таблица 7 – Определение качественного состава микрофлоры зерна

Культуральные признаки (описание колоний)	Морфологические признаки (форма клеток и т.д.)	Окраска по Граму

На основании микробиологического анализа делают заключение о качестве фуражного зерна (зернопродуктов).

В посевах свежего доброкачественного зерна выделяют:

80 %		<i>Pseudomonas herbicola</i>	Образуют блестящие оранжевые колонии желтовато-зеленоватые
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	флуоресцирующие колонии непигментированные колонии неспорообразующих палочек.
20 %		Дрожжи	блестящие выпуклые колонии, окрашенные в розовые тона.

На зерне (зернопродуктах), хранившемся в условиях повышенной влажности, выделяются – несвежем:

- ✓ микрококки, образующие мелкие, белые, блестящие, плоские колонии;
- ✓ спорообразующие морщинистые палочки, матовые колонии;
- ✓ актиномицеты;
- ✓ грибы, главным образом *Penicillium*, *Aspergillus*.

Микробиология силоса. При силосовании кормов первостепенную роль играют молочнокислые микроорганизмы, входящие в состав эпифитной микрофлоры силосуемых растений. Состав групп микроорганизмов силосуемой массы приводится в таблице 8.

В основе силосования кормов лежит молочнокислое брожение, следовательно, необходимым является создание анаэробных условий, благоприятных для развития молочнокислых бактерий, входящих в состав эпифитного микробоценоза. Такие условия создаются за счет уплотнения, а в процессе силосования выделяют 3 стадии:

1. Развитие смешанной микрофлоры (до уплотнения).
2. Развитие молочнокислых микроорганизмов, сопровождающееся накоплением молочной кислоты (консерванта) и изменением рН среды до 4,0–4,2. Гнилостные микроорганизмы погибают.
3. Стадия консервирования. Через 2 недели микробиологические процессы в основном заканчиваются.

Таблица 8 – Характеристика эпифитного микробоценоза силосуемой массы (средние данные)

Группа микроорганизмов	Видовая принадлежность	Относительное содержание, %
Гнилостные	<i>Pseudomonas herbicola</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	80
Молочнокислые	В том числе <i>Lactobacterium plantarum</i>	10
Споровые	<i>Bacillus</i>	2
Кишечной палочки	<i>E. coli</i>	2
Грибы, актиномицеты, дрожжевые грибы		5–6

Ход работы. Микробиологическое исследование силоса проводится не позднее суток после взятия пробы. Для приготовления препарата берут пинцетом силос и плотно прижимают его к предметному стеклу, чтобы на стекле остался отпечаток. Препарат сушат на воздухе, фиксируют в пламени спиртовки и окрашивают

метиленовым синим (2–3 мин). Микроскопируют с масляной иммерсионной системой и зарисовывают микроскопическую картину.

А. Микроскопическая картина на препарате силоса хорошего качества:

- ✓ молочнокислые бактерии;
- ✓ молочнокислые стрептококки.

Б. Микроскопическая картина на препарате силоса плохого качества:

- ✓ спорообразующие масляно-кислые бактерии;
- ✓ спорообразующие аэробные гнилостные бактерии;
- ✓ плесневые грибы.

Результаты проведенных исследований оформляют в виде **ВЫВОДОВ**.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сидоренко, О.Д. Микробиология: учебник / О.Д. Сидоренко, Е.Г. Борисенко, А.А. Ванькова [и др.]. – М.: Инфра-М, 2005. – 287 с.
2. Емцев, В.Т. Микробиология / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М.: Дрофа, 2005. – 445 с.
3. Шильникова, В.К. Микробиология: учеб. пособие / В.К. Шильникова, А.А. Ванькова, Г.В. Годова. – М.: Дрофа, 2006. – 268 с.
4. Полонская, Д.Е. Санитарная микробиология: лабораторный практикум / Д.Е. Полонская. – Красноярск: Изд-во КрасГАУ, 2010. – 28 с.
5. Боер, И.В. ЭУМК «Микробиология» [Электронный ресурс] / И.В. Боер, Д.Е. Полонская. URL: http://www.kgau.ru/distance/vet_06/boer_microbio.

МИКРОБИОЛОГИЯ СЫРЬЯ И ПРОДУКТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО И ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

*Методические указания
к лабораторным занятиям*

Боев Ирина Владимировна

Редактор Л.Ю. Беликова

Санитарно-эпидемиологическое заключение № 24.49.04.953.П. 000381.09.03 от 25.09.2003 г.

Подписано в печать .2015. Формат 60x84/16. Бумага тип. № 1.

Печать – ризограф. Усл. печ. л. Тираж 110 экз. Заказ №
Издательство Красноярского государственного аграрного университета
660017, Красноярск, ул. Ленина, 117