Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЛИНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

О. В. Казимирченко

МИКРОБИОЛОГИЯ РЫБЫ И РЫБНЫХ ПРОДУКТОВ

Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ
для студентов, обучающихся в бакалавриате по направлению подготовки
19.03.03 Продукты питания животного происхождения

Калининград
2023

УДК 579.2

Рецензент
кандидат биологических наук, доцент кафедры водных биоресурсов и аквакультуры ФГБОУ ВО «КГТУ» Е. А. Масюткина.

Казимирченко, О. В. Микробиология рыбы и рыбных продуктов: учеб.-методич. пособие по выполнению лабораторных работ для студ. бакалавриата по напр. подгот. 19.03.03 Продукты питания животного происхождения / **О. В. Казимирченко.** – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВО «КГТУ», 2023. – 26 с.

Локальный электронный методический материал. Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ. Рекомендовано к использованию в учебном процессе методической комиссией института рыболовства и аквакультуры ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет» «13» февраля 2023 г., протокол № 10

Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ рекомендовано к использованию в качестве локального электронного методического материала в учебном процессе методической комиссией института агроинженерии и пищевых систем 27 февраля 2023 г., протокол № 02

УДК 579.2
© Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Калининградский государственный технический университет», 2023 г.
© Казимирченко О.В., 2023 г.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 4
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1 6
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2 8
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3 10
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №4 13
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5 15
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6 18
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №7 23

ВВЕДЕНИЕ

Целью освоения дисциплины «Микробиология рыбы и рыбных продуктов» является формирование знаний общих закономерностей развития и обитания микроорганизмов в объектах внешней среды и в пищевых продуктах: об основных группах микроорганизмов – возбудителях порчи и механизмах микробиологических процессов, протекающих при производстве пищевых рыбных продуктов, потенциальных возбудителях пищевых отравлений, формирование знаний о роли различных групп микроорганизмов в процессах производства и хранения рыбы и рыбных продуктов, а также получение необходимых знаний о микробиологических процессах, обеспечивающих получение рыбной продукции высокого качества.

В результате изучения дисциплины студент должен:

знать:

- морфологические, физиологические и биологические особенности микроорганизмов рыбопромысловых водоемов, их влияние на качество и безопасность рыбных продуктов;
- основные биологические свойства микроорганизмов, вызывающих порчу рыбы и рыбных продуктов, а также возбудителей пищевых отравлений, передающихся через рыбу и рыбные продукты;
- микробиологические основы заготовки, консервирования и хранения рыбы и рыбных продуктов;
- влияние технологических режимов, условий обработки и хранения сырья на качественный и количественный состав микроорганизмов;
- основные санитарно-гигиенические требования в производстве рыбных продуктов;
- общие технологические процессы в производстве рыбных продуктов; особенности санитарного контроля на рыбоперерабатывающих предприятиях.

уметь:

- использовать схемы и методы микробиологического контроля сырья и готовой продукции, объектов производственного цикла в производстве рыбных продуктов, а также личной гигиены работников пищевых предприятий;
- анализировать полученные данные по наличию условно-патогенных и патогенных для организма человека микроорганизмов;
- провести санитарно-микробиологическое исследование рыбы и рыбных продуктов, вспомогательных материалов, воды, воздуха, технологического оборудования, выделить и идентифицировать различные группы бактерий и микроскопических грибов;
- провести гигиеническую оценку сроков годности и показателей микробиологической безопасности рыбы и рыбных продуктов;
- разрабатывать программы санитарного производственного контроля;

- осуществлять поиск и анализ технической информации и документации.

владеть:

- приемами системного анализа качества рыбы и рыбных продуктов с целью прогнозирования возможных изменений в процессах переработки, хранения и разработки рыбных продуктов с заданными свойствами;

- навыками работы с живыми культурами микробов, микроскопическими препаратами, питательными средами, лабораторным микробиологическим оборудованием;

- специфическими правилами техники безопасности при работе с микроорганизмами;

- техникой выделения чистой культуры и методами идентификации микроорганизмов;

- методиками микробиологического анализа рыбы и рыбных продуктов и обработки результатов для использования в профессиональной деятельности;

- приёмами определения гигиенической безопасности рыбного сырья и готовых рыбных продуктов.

В результате прохождения лабораторных работ у студентов формируются умения по проведению санитарно-микробиологических исследований рыбы и рыбных продуктов, вспомогательных материалов, объектов внешней среды, выделению и идентификации бактерий и микроскопических грибов, гигиенической оценки сроков годности и показателей микробиологической безопасности рыбы и рыбных продуктов, анализу полученных данных по наличию условно-патогенных и патогенных для организма человека микроорганизмов, разработке программы санитарного производственного контроля, осуществлению поиска и анализу технической информации и документации.

Студенты приобретают навыки работы с живыми культурами микробов, микроскопическими препаратами, с питательными средами, лабораторным микробиологическим оборудованием, специфическими правилами техники безопасности работы с микроорганизмами, а также навыки по технике выделения чистой культуры, методам идентификации микроорганизмов, микробиологического анализа качества рыбы и рыбных продуктов и обработке результатов для использования в профессиональной деятельности, определению гигиенической безопасности рыбного сырья и готовых рыбных продуктов.

Лабораторные работы по дисциплине проводятся в специализированной микробиологической лаборатории, отвечающей соответствующим требованиям. Выполнение работ осуществляется в лабораторных халатах при строгом соблюдении правил техники безопасности с живыми культурами микроорганизмов, спиртовыми горелками, микроскопами и другим лабораторным оборудованием.

Лабораторная работа №1.
Подготовка микробиологической посуды, приготовление питательных сред, используемых для микробиологического анализа рыбы и рыбных продуктов.

Цель работы: формирование умений и навыков по особенностям техники безопасности при осуществлении микробиологических посевов мяса и мясных продуктов, живыми культурами микроорганизмов; подготовке лабораторной посуды к стерилизации и приготовлению питательных сред.

Задание по работе: прочитать и законспектировать правила работы и техники безопасности в микробиологической лаборатории; подготовить чашки Петри, стеклянные пипетки, ступки, пестики, шпатели к тепловой стерилизации; приготовить физиологические растворы, питательные среды, требуемые для микробиологических посевов рыбы и рыбных продуктов; заполнить отчет о работе в табличной форме, сделать выводы.

Материалы и оборудование: чашки Петри, пробирки биологические, пипетки, фарфоровые ступки, пестики, шпатели, ватно-марлевые пробки, питательные среды различного назначения, хлорид натрия, электронные весы, электроплитка, шпатели, дистиллированная вода, мерные цилиндры, колбы.

Методические указания по выполнению работы.

1. Ознакомиться с правилами работы и техники безопасности в микробиологической лаборатории. Внести личные данные и поставить подпись в Журнале регистрации инструктажа по охране труда на рабочем месте для студентов;
2. Завернуть в плотную бумагу чашки Петри, пипетки, фарфоровые ступки, пестики, шпатели; перед заворачиванием пипеток в бумагу в конец пипетки, который помещается в дозатор, вставить ватный тампон на глубину не более 1 см. Посуда должна быть подготовлена таким образом, чтобы не оставалось не обернутых бумагой участков.
3. Подготовленную лабораторную посуду передать в стерилизационную комнату для проведения сухожаровой стерилизации;
4. В колбах приготовить различные питательные среды для микробиологических посевов: мерным цилиндром отмерить необходимое количество дистиллированной воды, внести определенную навеску сухой питательной среды согласно прописи, указанной на банке со средой.
5. Содержимое колб размешать, колбы поставить на электроплитки, среды довести до кипения, постоянно помешивая во избежание пригорания сред. Питательные среды прокипятить не менее трех раз до получения прозрачности раствора.
6. Горячие питательные среды в объеме 10 мл разлить по пробиркам. Пробирки закрыть ватно-марлевыми пробками. Собранные пробирки накрыть бумажным колпачком, на котором написать название питательной среды, связать жгутом.

7. В колбе приготовить 100 мл физиологического раствора: в мерную колбу внести 0,9 г хлорида натрия NaCl, довести объем дистиллированной водой до 100 мл. Содержимое колбы тщательно перемешать.

8. Приготовленный физиологический раствор в объеме 10 мл разлить по пробиркам. Пробирки закрыть ватно-марлевыми пробками. Собранные пробирки накрыть бумажным колпачком, на котором написать название среды, связать жгутом.

9. Подготовленные питательные среды передать в автоклавную для автоклавирования.

Форма предоставления отчётных материалов.

По результатам проделанной работы заполнить таблицы, сделать выводы.

Таблица 1

Подготовка посуды к стерилизации

Вид лабораторной посуды	Количество лабораторной посуды	Наименование и режим стерилизации лабораторной посуды

Таблица 2

Приготовление питательных сред

Наименование питательных сред	Объем и количество питательной среды (в зависимости от вида лабораторной посуды)	Рецептуры и способ приготовления питательных сред	Наименование и режим стерилизации питательных сред

Вопросы для самопроверки

1. Расскажите о правилах работы и технике безопасности в микробиологической лаборатории.

2. Каковы требования к технике безопасности при проведении первичных микробиологических посевов рыбного сырья и рыбных продуктов?

3. Каковы требования к технике безопасности при проведении идентификации групп микроорганизмов, нормируемых в рыбном сырье и рыбных продуктах?

4. Как подготавливается лабораторная посуда к стерилизации? Какой метод стерилизации лабораторной посуды используется?

5. Расскажите о правилах приготовления питательных сред.

6. Какой метод используется при стерилизации питательных сред?

7. Какие методы применяются для стерилизации питательных сред, содержащих ингредиенты, разрушающиеся при температуре выше 100 ^{0}С?

Лабораторная работа №2
Методики посева материала и пересева культур бактерий на питательные среды.

Цель работы: формирование умений и навыков по методам посева материала и пересева культур бактерий на питательные среды различного назначения, особенностям роста бактерий на твердых и жидких питательных средах.

Задание по работе: пересеять культуры бактерий методом «штриха», «истощающего штриха» в чашки Петри на рыбопептонный агар, на скошенный рыбопептонный агар, методом «укола» в пробирку с углеводной средой, произвести пересев культуры бактерий в жидкую среду; заполнить отчет о работе в табличной форме, сделать выводы.

Материалы и оборудование: чашки со стерильным рыбопептонным агаром, пробирки со стерильным скошенным рыбопептонным агаром, пробирки с углеводной средой, пробирки с жидкой питательной средой (рыбопептонный бульон или пептонная вода), пробирки с культурами бактерий, карандаши (маркеры) по стеклу, бактериологические петли, вата, марлевые салфетки, спиртовка, спирт этиловый, спички.

Методические указания по выполнению работы.

1. В пламени спиртовки обжечь бактериологическую петлю по всей длине металлической части.
2. Охлаждённую петлю ввести в пробирку с культурой (предварительно обжечь пробку и горлышко пробирки) и аккуратно взять часть бактериального налёта, старясь не повредить поверхность питательной среды. Обжечь горлышко и пробку, пробирку закрыть и поставить в штатив.
3. Отобранную культуру бактерий перенести в чашку с рыбопептонным агаром и произвести рассев материала методом «штриха». Штрихи наносить как можно ближе друг к другу, чтобы полностью засеять поверхность питательной среды в чашке Петри.
4. Обжечь пробку и горлышко пробирки, пробирку закрыть и поместить в штатив. Остатки культуры на петле сжечь в пламени, не допуская разбрызгивания.
5. В пламени спиртовки вновь обжечь бактериологическую петлю по всей длине металлической части.
6. Охлаждённую петлю ввести в пробирку с культурой (предварительно обжечь пробку и горлышко пробирки) и аккуратно взять часть бактериального налёта, старясь не повредить поверхность питательной среды. Обжечь горлышко и пробку, пробирку закрыть и поставить в штатив.
7. Отобранную культуру бактерий перенести в чашку с рыбопептонным агаром и произвести рассев материала методом «истощающего штриха». Штрихи наносить как можно ближе друг к другу, чтобы произвести рассев материала по трем зонам штрихов.

8. Обжечь пробку и горлышко пробирки, пробирку закрыть и поместить в штатив. Остатки культуры на петле сжечь в пламени, не допуская разбрызгивания.

9. Обеззараженной в пламени спиртовки бактериологической петлей отобрать культуру бактерий согласно правилам, описанным выше, и штрихом произвести рассев культуры по поверхности скошенного рыбопептонного агара снизу вверх, не повреждая питательную среду. Обжечь пробку и горлышко пробирки, пробирку закрыть и поместить в штатив. Остатки культуры на петле сжечь в пламени, не допуская разбрызгивания.

10. Обеззараженной в пламени спиртовки бактериологической петлей отобрать культуру бактерий согласно правилам, описанным выше, и методом «укола» произвести пересев культуры в столбик питательной среды с углеводом. Обжечь пробку и горлышко пробирки, пробирку закрыть и поместить в штатив. Остатки культуры на петле сжечь в пламени, не допуская разбрызгивания.

11. Обеззараженной в пламени спиртовки бактериологической петлей отобрать культуру бактерий согласно правилам, описанным выше, и произвести пересев культуры в жидкую питательную среду, разлитую в пробирку (например, рыбопептонный агар, пептонная вода). Обжечь пробку и горлышко пробирки, пробирку закрыть и поместить в штатив. Остатки культуры на петле сжечь в пламени, не допуская разбрызгивания.

12. Засеянные пробирки, чашку Петри подписать карандашом (маркером) по стеклу с указанием латинского названия культуры бактерий, даты пересева, фамилии исполнителя.

13. Засеянные пробирки, чашку Петри поместить в термостат с установленной температурой 37 ^{0}С.

Форма предоставления отчётных материалов.

По результатам проделанной работы заполнить таблицы, сделать выводы.

Пересев культуры бактерий

Наименование бактериальной культуры	Метод и техника пересева	Вид питательной среды для пересева	Условия инкубации культуры бактерий

Вопросы для самопроверки

1. Как осуществляют культивирование микроорганизмов?
2. Что такое посев и пересев культур микроорганизмов?
3. Расскажите о технике пересева культуры бактерий методом «штриха» в чашку Петри на плотную среду и в пробирку на скошенную питательную среду.
4. Как осуществляют пересев культуры бактерий методом «истощающего штриха»?
5. Как осуществляют пересев культуры бактерий методом «укола»?
6. Как осуществляют пересев культуры бактерий в пробирку с жидкой питательной средой?

Лабораторная работа №3
Культуральные, морфологические и физиолого-биохимические признаки бактерий.

Цель работы: формирование умений и навыков по особенностям роста бактерий на питательных средах общего и специального назначения, простым и сложным методам окраски бактерий, микроскопии окрашенных препаратов, изучению физиолого-биохимических признаков бактерий.

Задание по работе: изучить культуральные, морфологические и физиолого-биохимические признаки выросшей культуры бактерий на питательных средах различного назначения; заполнить отчет о работе в табличной форме, сделать выводы.

Материалы и оборудование: выросшие культуры бактерий на скошенном рыбопептонном агаре, в чашке Петри с рыбопептонным агаром, в пробирке с углеводной средой, с жидкой питательной средой, набор красителей для окраски по методу Грама, фильтровальная бумага, стеклянная чаша со стеклянным мостиком, бактериологическая петля, предметные стёкла, спиртовая смесь для обезжиривания предметных стекол или кусочки мыла, микроскоп с иммерсионным объективом, иммерсионное масло, вода, карандаши (маркеры) по стеклу, вата, марлевые салфетки, спиртовка, спирт этиловый, спички, песочные часы.

Методические указания по выполнению работы.

1. Охарактеризовать культуральные признаки выросшей культуры бактерий на скошенном рыбопептонном агаре, на рыбопептонном агаре в чашке Петри.
2. На обезжиренном предметном стекле приготовить тонкий мазок из культуры бактерий, снятой бактериологической петлёй со скошенного питательного агара.
3. Мазок подсушить над пламенем спиртовки и зафиксировать в пламени.
4. Остуженный мазок окрасить по методу Грама.
5. Окрашенный препарат подсушить фильтровальной бумагой, по центру стекла нанести каплю иммерсионного масла.
6. Препарат, приготовленный из культуры бактерий, микроскопировать. Описать морфологические признаки бактерий, клетки бактерий зарисовать. Определить чистоту культуры бактерий.
7. Охарактеризовать физиологические признаки изучаемой культуры бактерий при росте в углеводной среде: определить подвижность бактерий, тип дыхания, отношение к температуре.

Подвижность бактерий определяют по росту в столбике питательной полужидкой среды. Подвижные бактерии вырастают на всей поверхности среды и (или) вызывают ее диффузное помутнение, неподвижные – растут строго по уколу.

При определении *типа дыхания* бактерий также анализируют характер роста бактерий в столбике полужидкой среды. Аэробы, развитие которых происходит в атмосфере кислорода, растут поверхностной пленкой. Анаэробы, не нуждающиеся в кислороде, растут в глубине среды, у дна пробирки. Факультативные анаэробы, размножение которых может происходить как при наличии, так и в отсутствие молекулярного кислорода, растут в виде поверхностной пленки и равномерно по всему уколу. Микроаэрофильные бактерии, требующие для своей жизнедеятельности малое количество кислорода только на первых этапах развития, растут в верхней трети столбика полужидкой среды.

При определении отношения изучаемых бактерий к *температуре* учитывают, что оптимальная температура развития мезофильных бактерий от +10 до +15 ^{0}С, максимальная – около +30 ^{0}С, минимальная – от -10 ^{0}С до 0 ^{0}С; у психрофильных бактерий оптимальная температура развития от +25 до +40 ^{0}С, максимальная – около +45 +50 ^{0}С, минимальная – +5 + 10 ^{0}С; у термофильных бактерий оптимальная температура развития от +50 +60 ^{0}С, максимальная – около +70 +80 ^{0}С (могут выдерживать +100 ^{0}С), минимальная – около +30 ^{0}С.

8. Охарактеризовать биохимические признаки изучаемой культуры бактерий при росте в углеводной среде: определить характер расщепления углевода: при расщеплении углевода до кислоты происходит изменение цвета среды в пробирке; при выделении газа в пробирке появляются пузырьки или происходят разрывы в столбике среды.

9. Определить ферментную активность изучаемой культуры бактерий по тестам на цитохромоксидазу и каталазу.

1) Для выявления фермента *цитохромоксидазы* на предметное стекло поместить кусочек фильтровальной бумаги, на бумагу нанести каплю смешанного реактива на оксидазу (1% -ный спиртовый α-нафтол и 1%-ный водный β-диметилпарафенилдиамин, смешанные в соотношении 1:1) и в каплю бактериологической петлей внести часть колонии бактерий. Реакция считается *положительной*, если в течение 1 мин появляется синее окрашивание культуры бактерий. При *отрицательной* реакции цвет в месте нанесения культуры не меняется.

2) Для выявления фермента *каталазы* на предметное стекло нанести каплю 3,5%-ной перекиси водорода. Внести в нее бактериологическую петлю с культурой бактерий и выдержать несколько секунд. При наличии каталазы вследствие выделения газообразного кислорода колония бактерий начинает «пениться» (выделяются пузырьки газа), при отсутствии каталазы – выделение пузырьков газа отсутствует.

Форма предоставления отчётных материалов.

По результатам проделанной работы заполнить таблицы, сделать выводы.

Таблица 1

Культуральные признаки бактерий со скошенного рыбопептонного агара

Интенсивность и характер роста культуры	Поверхность колонии, оптические свойства колонии	Цвет колонии	Край колонии	Консистенция культуры

Таблица 2

Культуральные признаки колонии бактерий по росту на рыбопептонном агаре в чашке Петри

Поверхность колонии, оптические свойства колонии	Край колонии	Цвет колонии	Поверхность колонии	Консистенция

Таблица 3

Морфологические признаки бактерий на окрашенном препарате

Грам-принадлежность	Форма бактерий	Расположение бактерий	Наличие споры у бактерий и ее расположение	Чистота культуры	Рисунок препарата

Таблица 4

Физиологические признаки бактерий по росту на углеводной среде

Тип дыхания	Отношение к температуре	Подвижность

Таблица 5

Биохимические признаки бактерий

Фермент цитохромоксидаза	Фермент каталаза	Расщепление углевода (*указать наименование углевода*)	
		кислота	газообразование

Вопросы для самопроверки

1. Как изучают культуральные признаки на скошенном рыбопептонном агаре? Какие признаки используют для описания культуры бактерий?

2. Как изучают культуральные признаки на рыбопептонном агаре в чаше Петри? Какие признаки используют для описания культуры бактерий?

3. Назовите основные формы бактериальных клеток, типы расположения клеток бактерий относительно друг друга.

4. Как определяют наличие споры у споровых палочковидных бактерий на окрашенном препарате?

5. Расскажите о способе приготовления фиксированного препарата из клеток бактерий и технике окраски бактерий по методу Грама.

6. Как по окрашенному препарату различают грамположительные и грамотрицательные клетки бактерий?

7. Расскажите о технике микроскопирования окрашенного бактериального препарата.

8. Перечислите морфологические признаки бактерий, которые определяются при микроскопии мазка, окрашенного по Граму.

9. Какие признаки относятся к физиологическим признакам и как их определяют по углеводной среде?

10. Какие признаки относятся к биохимическим признакам?

11. Как выявляют в клетках бактерий фермент цитохромоксидазу?

12. Как выявляют в клетках бактерий фермент каталазу?

13. Как определяют характер ферментации углевода?

Лабораторная работа №4
Микробиологический посев рыбного сырья: составление схемы анализа, работа с нормативной документацией.

Цель работы: формирование умений и навыков по особенностям проведения микробиологического посева рыбного сырья.

Задание по работе: изучить методики посева рыбного сырья для выявления санитарно-показательных, условно-патогенных, патогенных микроорганизмов и бактерий порчи; составить схему посева; изучить соответствующую нормативную документацию, выписать нормативные показатели микробиологической безопасности рыбного сырья; заполнить отчет о работе в табличной форме, сделать выводы.

Материалы и оборудование: нормативная документация, регламентирующая объем испытаний по определению микробиологической безопасности рыбного сырья и методы анализа, демонстрационные материалы по схеме посева рыбного сырья.

Методические указания по выполнению работы.

1. По нормативным документам, регламентирующих объем испытаний по определению микробиологической безопасности рыбного сырья, выписать нормативные микробиологические показатели.

2. По нормативным документам, регламентирующим методики микробиологического анализа рыбного сырья, составить схему посева:

- проведение 10-кратный разведений навески продукта;
- определение показателя КМАФАнМ (количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов);
- определение санитарно-показательных бактерий: бактерии группы кишечных палочек (БГКП), бактерии рода *Enterococcus*;
- определение условно-патогенных бактерий: бактерии *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus*, сульфитредуцирующие клостридии, парагемолитические вибрионы;

- определение патогенных бактерий: бактерии рода *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*;

- определение микробов-порчи: дрожжевые и плесневые грибы.

3. Составить перечень необходимых питательных сред, лабораторной посуды.

Форма предоставления отчётных материалов.

По результатам проделанной работы заполнить таблицы, сделать выводы.

Таблица 1

Микробиологические нормативы безопасности рыбного сырья (патогенные микроорганизмы)

Показатель	Масса продукта (г), в которой не допускается
Патогенные микроорганизмы, в т. ч. сальмонеллы	
Listeria monocytogenes	

Таблица 2

Микробиологические нормативы безопасности рыбного сырья (санитарно-показательные, условно-патогенные микроорганизмы, микробы-порчи)

Показатель	Допустимый уровень
БГКП (коли-формы)	
Бактерии рода Enterococcus	
Escherichia coli	
Staphylococcus aureus	
Бактерии рода Proteus	
Сульфитредуцирующие клостридии	
Парагемолитические вибрионы	
Дрожжи	
Плесени	

Таблица 3

Первичный микробиологический посев рыбного сырья

Показатель	Нормативный документ на метод анализа	Необходимые питательные среды, лабораторная посуда, другие материалы

Вопросы для самопроверки

1. Как нормируются микробиологические показатели безопасности рыбного сырья?
2. Какие нормативные документы регламентируют объем микробиологических испытаний?
3. Какие нормативные документы регламентируют методы микробиологических анализов?
4. Как проводят 10-кратные разведения исходного навески продукта? Какие питательные среды и материалы необходимы?
5. Как определяют показатель КМАФАнМ? Какие питательные среды и материалы необходимы для определения данного показателя?
6. Как определяют санитарно-показательных микроорганизмов? Какие питательные среды и материалы необходимы для определения данных групп микроорганизмов?
7. Как определяют условно-патогенные микроорганизмы? Какие питательные среды и материалы необходимы для определения данных групп микроорганизмов?
8. Как определяют патогенные микроорганизмы? Какие питательные среды и материалы необходимы для определения данных групп микроорганизмов?
9. Как определяют микробы-порчи? Какие питательные среды и материалы необходимы для определения данных групп микроорганизмов?

Лабораторная работа №5
Микробиологический посев рыбного сырья: определение нормируемых групп микроорганизмов.

Цель работы: формирование умений и навыков по методам микробиологического посева рыбного сырья.

Задание по работе: провести микробиологический посев рыбного сырья по нормируемым показателям.

Материалы и оборудование: физиологический раствор, разлитый в колбы объемом 90 мл и пробирки (по 9 мл), стерильные чашки Петри, стерильные питательные среды: рыбопептонный агар, среда Кесслера, азидный агар, скошенный рыбопептонный агар, солевой рыбопептонный бульон (6% хлорида натрия), агар Сабуро, железосульфитный агар, пептонная вода с 3% хлорида натрия, дифференциально-диагностический агар, забуференная пептонная вода (в колбе, объем среды 225 мл), питательный бульон для листерий (в колбе, объем среды 225 мл), стерильные пипетки, дозаторы для пипеток, стерильные ступки, стерильные пестики, карандаши (маркеры) по стеклу, вата, марлевые салфетки, инструменты (ножницы, скальпели, пинцеты), погруженные в стакан со спиртом, предметные стекла, набор красителей для окраски препаратов по методу Грама, биологический микроскоп, иммерсионное

масло, пинцеты, вата, бактериологическая петля, песочные часы, фильтровальная бумага, стеклянная чаша со стеклянным мостиком, емкость с дезинфицирующим средством, спиртовка, спирт этиловый, спички, термостаты.

Методические указания по выполнению работы.

1. В асептических условиях взвесить соответствующие навески рыбы. Навески измельчить стерильным пестиком в стерильной ступке.

2. Измельчённую навеску рыбного сырья (10 г) предварительно развести в стерильном физиологическом растворе 10-кратно несколько раз.

3. Из соответствующих разведений произвести высевы в стерильные чашки Петри и в пробирки на жидкие и плотные питательные среды для определения показателей, нормируемых в рыбном сырье.

4. Измельчённые навески рыбного сырья (по 25 г) поместить в соответствующие накопительные питательные среды для определения патогенных бактерий.

5. Посевы поместить в термостаты на требуемые температуры согласно нормативной документации.

6. После термостатирования на чашках с рыбопептонным агаром и агаром Сабуро произвести расчеты бактериальной обсемененности и обсеменённости рыбного сырья микроскопическими грибами. Сравнить полученные результаты с действующими нормативными документами по безопасности рыбного сырья.

7. В первичных посевах на наличие (отсутствие) санитарно-показательных, условно-патогенных, патогенных микроорганизмов провести учет результатов по характерному изменению питательных сред, при необходимости произвести высев на дифференцирующие питательные среды для изучения физиолого-биохимических признаков.

8. При идентификации санитарно-показательных, условно-патогенных и патогенных микроорганизмов приготовить мазки, окрасить по методу Грама, микроскопировать. Описать морфологические признаки бактерий, провести сравнение с описанием морфологии анализируемой группы в соответствующей нормативной документации.

9. Полученные результаты свести в протокол анализа рыбного сырья, написать заключение о микробиологической безопасности испытуемого образца.

Форма предоставления отчётных материалов.

По результатам проделанной работы заполнить таблицы, сделать выводы.

Таблица 1

Результаты микробиологического анализа рыбного сырья
(общая бактериальная обсемененность)

Показатель	Нормируемое значение	Результат испытания
КМАФАнМ		

Таблица 2

Результаты микробиологического анализа рыбного сырья
(патогенные микроорганизмы)

Показатель	Нормируемое значение	Результат испытания
Патогенные микроорганизмы, в т. ч. сальмонеллы		
Listeria monocytogenes		

Таблица 3

Результаты микробиологического анализа рыбного сырья
(санитарно-показательные микроорганизмы)

Показатель	Нормируемое значение	Результат испытания
БГКП (коли-формы)		
Бактерии рода Enterococcus		

Таблица 4

Результаты микробиологического анализа рыбного сырья
(условно-патогенные микроорганизмы)

Показатель	Нормируемое значение	Результат испытания
Escherichia coli		
Staphylococcus aureus		
Бактерии рода Proteus		
Сульфитредуцирующие клостридии		
Парагемолитические вибрионы		

Таблица 5

Результаты микробиологического анализа рыбного сырья
(микробы-порчи)

Показатель	Нормируемое значение	Результат испытания
Дрожжи		
Плесени		

Вопросы для самопроверки

1. Как рассчитывается показатель общей бактериальной обсемененности рыбного сырья? Каковы правила расчета и записи окончательного результата по данному показателю?

2. По каким дифференцирующим признакам определяют наличие в рыбном сырье бактерий группы кишечных палочек? Как записывают окончательный результат в протоколе испытания по данному показателю?

3. По каким дифференцирующим признакам определяют наличие в рыбном сырье фекальных энтерококков? Как записывают окончательный результат в протоколе испытания по данному показателю?

4. По каким дифференцирующим признакам определяют наличие в рыбном сырье золотистого стафилококка? Как записывают окончательный результат в протоколе испытания по данному показателю?

5. По каким дифференцирующим признакам определяют наличие в рыбном сырье протеусов? Как записывают окончательный результат в протоколе испытания по данному показателю?

6. По каким дифференцирующим признакам определяют наличие в рыбном сырье сульфитредуцирующих клостридий? Как записывают окончательный результат в протоколе испытания по данному показателю?

7. По каким дифференцирующим признакам определяют наличие в рыбном сырье парагемолитических вибрионов? Как записывают окончательный результат в протоколе испытания по данному показателю?

8. По каким дифференцирующим признакам определяют наличие в рыбном сырье патогенных сальмонелл и листерий? Как записывают окончательные результаты в протоколе испытания по данным показателям?

9. По каким дифференцирующим признакам определяют наличие в рыбном сырье дрожжей и плесеней? Как рассчитывается показатель обсемененности рыбного сырья микроскопическими грибами? Как записывают окончательный результат в протоколе испытания по данному показателю?

Лабораторная работа №6
Микробиологический посев рыбных продуктов

Цель работы: формирование умений и навыков по методам проведения микробиологического посева рыбных продуктов.

Задание по работе: изучить методики посева рыбных продуктов для выявления санитарно-показательных, условно-патогенных, патогенных микроорганизмов и бактерий порчи; составить схему посева по определенному виду рыбного продукта согласно индивидуальному заданию (*на выбор студента или преподавателя*); изучить соответствующую нормативную документацию, выписать нормативные показатели микробиологической безопасности рыбных продуктов; провести посев рыбных продуктов; заполнить отчет о работе в табличной форме, сделать выводы.

Материалы и оборудование: физиологический раствор, разлитый в колбы объемом 90 мл и пробирки (по 9 мл), стерильные чашки Петри, стерильные питательные среды: рыбопептонный агар, среда Кесслера, азидный агар, скошенный рыбопептонный агар, солевой рыбопептонный бульон (6% хлорида натрия), агар Сабуро, железосульфитный агар, пептонная вода с 3% хлорида натрия, дифференциально-диагностический агар, забуференная пептонная вода (в колбе, объем среды 225 мл), питательный бульон для листерий (в колбе, объем среды 225 мл), стерильные пипетки, дозаторы для пипеток, стерильные ступки, стерильные пестики, карандаши (маркеры) по стеклу, вата, марлевые салфетки, инструменты (ножницы, скальпели, пинцеты),

погруженные в стакан со спиртом, предметные стекла, набор красителей для окраски препаратов по методу Грама, биологический микроскоп, иммерсионное масло, пинцеты, вата, бактериологическая петля, песочные часы, фильтровальная бумага, стеклянная чаша со стеклянным мостиком, емкость с дезинфицирующим средством, спиртовка, спирт этиловый, спички, термостаты.

Методические указания по выполнению работы.

1. По нормативным документам, регламентирующих объем испытаний по определению микробиологической безопасности рыбных продуктов, выписать нормативные микробиологические показатели.

2. По нормативным документам, регламентирующим методики микробиологического анализа рыбных продуктов, составить схему посева.

3. Составить перечень необходимых питательных сред, лабораторной посуды.

4. В асептических условиях взвесить соответствующие навески рыбных продуктов. Навески измельчить стерильным пестиком в стерильной ступке.

2. Измельчённую навеску рыбного продукта (10 г) предварительно развести в стерильном физиологическом растворе 10-кратно несколько раз.

3. Из соответствующих разведений произвести высевы в стерильные чашки Петри и в пробирки на жидкие и плотные питательные среды для определения показателей, нормируемых в рыбных продуктах.

4. Измельчённые навески рыбных продуктов (по 25 г) поместить в соответствующие накопительные питательные среды для определения патогенных бактерий.

5. Посевы поместить в термостаты на требуемые температуры согласно нормативной документации.

6. После термостатирования на чашках с рыбопептонным агаром и агаром Сабуро произвести расчеты бактериальной обсемененности и обсеменённости продукта микроскопическими грибами. Сравнить полученные результаты с действующими нормативными документами по безопасности соответствующего рыбного продукта.

7. В первичных посевах на наличие (отсутствие) санитарно-показательных, условно-патогенных, патогенных микроорганизмов провести учет результатов по характерному изменению питательных сред, при необходимости произвести высев на дифференцирующие питательные среды для изучения физиолого-биохимических признаков.

8. При идентификации санитарно-показательных, условно-патогенных и патогенных микроорганизмов приготовить мазки, окрасить по методу Грама, микроскопировать. Описать морфологические признаки бактерий, провести сравнение с описанием морфологии анализируемой группы в соответствующей нормативной документации.

9. Полученные результаты свести в таблицы анализа рыбного продукта, написать заключение о микробиологической безопасности испытуемого образца.

10. По анализируемому продукту также привести информацию по формированию состава его микрофлоры, представить технологическую схему производства продукта с указанием всех этапов процесса производства, составить схему производственного контроля, контроля сырья и ингредиентов по микробиологическим критериям (все данные свести в таблицы).

Форма предоставления отчётных материалов.

По результатам проделанной работы и анализу нормативной документации по испытуемому рыбному продукту представить следующий отчет.

1. Характеристика рыбного продукта (*указать наименование продукта*).

По данному пункту отчета внести описание продукта согласно ГОСТ или иным действующим нормативным документам.

2. Формирование микрофлоры рыбного продукта (*указать наименование продукта*).

Наименование составляющих продукта	Состав микрофлоры
Сырьё	
Вспомогательные материалы	
Готовый продукт	

3. Технологический процесс производства рыбного продукта (*указать наименование продукта*).

В виде схемы представить технологический процесс производства исследуемого продукта. Описать каждый этап производства.

4. Требования, предъявляемые к безопасности рыбного продукта (*указать наименование продукта*) по микробиологическим критериям (основной микробиологический контроль)

Микробиологические нормативы безопасности
(патогенные микроорганизмы)

Показатель	Масса продукта (г), в которой не допускается	Периодичность контроля

Микробиологические нормативы безопасности
(санитарно-показательные, условно-патогенные микроорганизмы, микробы-порчи)

Показатель	Допустимый уровень	Периодичность контроля

5. Схема производственного контроля, контроля сырья и ингредиентов по микробиологическим критериям

Микробиологический контроль санитарного состояния производства рыбного продукта
(*указать наименование продукта*).

Объект контроля	Микробиологические показатели			Метод анализа	Периодичность контроля
Руки рабочих, занятых на ручных операциях					
Вода для технологических операций					
Стены производственных помещений					
Технологическое оборудование					
Рабочие поверхности					
Тара (контейнеры) для хранения продукта					
Инструментарий					

Дополнительный микробиологический контроль рыбного продукта
(*указать наименование продукта*).

Объект контроля	Микробиологические показатели			Метод анализа	Периодичность контроля
Сырьё					
Соль					
Сахар					
Пряности					
Яичный порошок					
Меланж					
Панировочные сухари					
Мука					
Томатная паста					
…….					

Протокол
по результатам микробиологического анализа рыбного продукта
(*указать наименование продукта*)

1. Наименование пробы:
2. Дата доставки пробы на испытание:
3. Даты исследований проб:
4. Нормативный документ, регламентирующий объем необходимых испытаний:
5. Нормативные документы на методы испытаний:
6. Исполнитель:

Результаты лабораторных испытаний

Наименование показателя	Нормативное значение	Результат испытания

Идентификация санитарно-показательных,
условно-патогенных и патогенных микроорганизмов,
нормируемых в рыбном продукте

Привести описание всех тестов, используемых для идентификации нормируемых групп микроорганизмов. На конечном этапе описания идентификации выделить жирным шрифтом или подчёркиванием заключительный тест, по которому сделали вывод о присутствии или отсутствии в продукте микроорганизмов.

Микробный фон продукта (характеристика остаточной микрофлоры)

Привести описание культуральных и морфологических признаков колоний бактерий, выросших на рыбопептонном агаре.

Заключение.

Указать соответствует ли продукт нормативным показателям безопасности. Если выявлено не соответствие, указать по какому показателю.

Вопросы для самопроверки

1. Как нормируются микробиологические показатели безопасности рыбных продуктов?
2. Какие нормативные документы регламентируют объем микробиологических испытаний?
3. Какие нормативные документы регламентируют методы микробиологических анализов?

4. Как проводят 10-кратные разведения исходного навески рыбного продукта? Какие питательные среды и материалы необходимы?

5. Как определяют показатель КМАФАнМ? Какие питательные среды и материалы необходимы для определения данного показателя?

6. Как определяют санитарно-показательных микроорганизмов в рыбных продуктах? Какие питательные среды и материалы необходимы для определения данных групп микроорганизмов? Как проводят идентификацию данных микроорганизмов?

7. Как определяют условно-патогенные микроорганизмы в рыбных продуктах? Какие питательные среды и материалы необходимы для определения данных групп микроорганизмов? Как проводят идентификацию данных микроорганизмов?

8. Как определяют патогенные микроорганизмы в рыбных продуктах? Какие питательные среды и материалы необходимы для определения данных групп микроорганизмов? Как проводят идентификацию данных микроорганизмов?

9. Как определяют микробы-порчи в рыбных продуктах? Какие питательные среды и материалы необходимы для определения данных групп микроорганизмов? Как проводят идентификацию данных микроорганизмов?

Лабораторная работа №7
Микробиологический посев стерилизованных рыбных консервов (определение промышленной стерильности)

Цель работы: формирование умений и навыков по методам проведения микробиологического анализа рыбных стерилизованных консервов (определение промышленной стерильности).

Задание по работе: провести анализ действующей нормативной документации по рыбным стерилизованным консервам; выписать нормативные показатели на продукт; ознакомиться со схемой анализа; подготовить соответствующие питательные среды и материалы; провести микробиологические посевы стерилизованных консервов по нормируемым показателям согласно действующей нормативной документации, провести расчеты бактериальной обсеменённости, идентифицировать группы микроорганизмов; заполнить протокол анализа, сделать выводы.

Материалы и оборудование: стерильные чашки Петри, рыбопептонный агар, агар Сабуро, питательные бульоны, разлитые в пробирки в объеме по 5 мл, питательные бульоны с добавлением глюкозы, разлитые в пробирки в объеме по 5 мл, расплавленная стерильная среда Китт-Тароцци, разлитая в пробирки в объеме 12 мл, стерильные пипетки, дозаторы для пипеток, стерильные стеклянные палочки, пробойники, предметные стекла, набор красителей для окраски препаратов по методу Грама, биологический микроскоп, иммерсионное масло, пинцеты, вата, бактериологическая петля, песочные часы,

фильтровальная бумага, стеклянная чаша со стеклянным мостиком, емкость с дезинфицирующим средством, спиртовка, спички, термостаты, водяная баня.

Методические указания по выполнению работы.

1. Провести анализ действующей нормативной документации по стерилизованным консервам.

2. Выписать нормативные показатели на продукт.

3. Разработать схему анализа.

4. Подготовить соответствующие питательные среды и материалы.

5. Перед проведением анализа консервную банку вымыть водой с мылом, швы протереть щеткой. Банку ополоснуть, высушить.

6. В асептических условиях провести прокол консервной банки пробойником, предварительно обработанным этиловым спиртом.

7. С помощью стерильной трубочки отобрать необходимые навески мясных консервов.

8. Отобранные навески продукта рассеять по питательным средам согласно схеме анализа.

9. Для определения спорообразующих мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов группы *B. subtilis* по 1 г продукта поместить в две стерильные чашки Петри, которые затем залить расплавленным рыбопептоннным агаром.

10. Для определения плесеней и дрожжей в две стерильные чашки Петри поместить по 1 г продукта, чашки залить расплавленным агаром Сабуро.

11. Для определения мезофильных и термофильных микроорганизмов произвести посев по 1 г продукта в пробирки с рыбопептонным бульоном с добавление глюкозы, для выявления споровых мезофильных бактерий – в пробирки с рыбопептонным бульоном, которую прогреть при температуре 80 и 95 ^{0}С соответственно.

12. Для определения мезофильных анаэробных микроорганизмов 1 продукта поместить в пробирку с питательной средой Китт-Тароцци.

13. Посевы поместить в термостаты на требуемые температуры согласно нормативной документации.

14. После термостатирования на чашках и в пробирках провести учет роста групп микроорганизмов.

15. По чашкам с рыбопептонным агаром провести расчет общей бактериальной обсеменённости консервов (*определение спорообразующих мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов группы B. subtilis*): подсчитать количество колоний бактерий на обеих чашках с рыбопептонным агаром, вывести среднее значение. Результат представить как «количество клеток в 1 г (см^3) продукта».

16. По чашкам с агаром Сабуро посмотреть рост колоний дрожжей и плесневых грибов.

17. По пробиркам с рыбопептонным бульоном описать культуральные признаки: отметить помутнение питательной среды, наличие поверхностной пленки, осадка, наличие газообразования. Приготовить мазки, окрасить по ме-

тоду Грама. Микроскопический препарат описать. Культуры бактерий проверить по тесту на фермент каталазу.

18. По пробирке со средой Китт-Тароцци описать культуральные признаки: отметить помутнение питательной среды, наличие газообразования. Приготовить мазки, окрасить по методу Грама. Микроскопический препарат описать. Культуры бактерий проверить по тесту на фермент каталазу.

19. Полученные результаты сравнить с действующими нормативными документами, определяющие микробиологические показатели безопасности консервированной рыбной продукции.

20. Полученные результаты свести в таблицу, написать заключение о микробиологической безопасности пробы.

Форма предоставления отчётных материалов.

По результатам проделанной работы заполнить таблицы, сделать выводы о соответствии исследованного образца консервированной продукции требованиям промышленной стерильности.

Результаты микробиологического анализа рыбных консервов
(определение промышленной стерильности)

Показатель	Нормируемое значение	Результат испытания

Вопросы для самопроверки

1. Какие микроорганизмы входят в состав остаточной микрофлоры рыбных стерилизованных консервов?

2. Как проводится термостатная выдержка рыбных стерилизованных консервов?

3. Какой вид микробиологической порчи можно выявить после термостатной выдержки рыбных стерилизованных консервов?

4. Что такое промышленная стерильность рыбных стерилизованных консервов?

5. Какие микробиологические показатели нормируются при определении промышленной стерильности рыбных консервов?

6. Как рассчитывается общая бактериальная обсемененность рыбных стерилизованных консервов по группе споровых бактерий *Bacillus subtilis*?

7. Как учитывается не споровая микрофлора рыбных стерилизованных консервов?

8. Как учитываются термофильные бактерии в рыбных стерилизованных консервах?

9. Как учитываются мезофильные споровые клостридии в рыбных стерилизованных консервах?

Локальный электронный методический материал

Оксана Владимировна Казимирченко

МИКРОБИОЛОГИЯ РЫБЫ И РЫБНЫХ ПРОДУКТОВ

Редактор И. Голубева

Локальное электронное издание

Уч.-изд. л. 1,9. Печ. л. 1,6.

Издательство федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего образования
«Калининградский государственный технический университет»
236022, Калининград, Советский проспект, 1