

**ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной
медицины им. Н.Э.Баумана»**

**Р.Г. Госманов, А.К. Галиуллин, Ф.М. Нургалиев, А.Х.Волков,
Г.Р. Юсупова**

**Микробиологический контроль мяса животных,
птицы, яиц и продуктов их переработки**

(учебно-методическое пособие для студентов и слушателей повышения
квалификации)

Казань – 2016 г.

Учебно-методическое пособие «Микробиологический контроль молока, мяса животных, птицы, яиц и продуктов их переработки» составлено профессором Р.Г. Госмановым, профессором А.К. Галиуллиным, доцентом Ф.М. Нургалиевым, профессором А.Х.Волковым, доктором биологических наук Г.Р. Юсуповой и предназначено для студентов по направлению подготовки –«Ветеринария», «Ветеринарно-санитарная экспертиза» и слушателей факультета повышения квалификации по специальности «Ветеринария».

Печатается по решению Ученого совета факультета ветеринарной медицины ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ от 21 марта 2016 г., протокол № 2.

Рецензенты:

доцент кафедры биологической и
неорганической химии ФГБОУ ВО
Казанская ГАВМ ,
доктор ветеринарных наук

Т.Р.Якупов

Заместитель директора по науке и
инновациям ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»,
доктор биологических наук

А.Н.Чернов

Введение

Мясо сельскохозяйственных и диких промысловых животных, птицы, яйца и продукты их переработки составляют значительную долю в рационе питания человека. Они служат источником биологически полноценных белков, жиров, витаминов и минеральных веществ, необходимых для нормального протекания жизненных процессов в организме. Однако продовольственное сырье и пищевые продукты животного происхождения могут представлять опасность, если они получены с нарушением санитарно-гигиенических правил при заготовке и на этапах обращения произведенной пищевой продукции (хранение, транспортирование, реализация) в результате инфицирования патогенной, токсигенной и сапрофитной микрофлорой.

Пути обсеменения мяса микрофлорой чрезвычайно разнообразны. Источником инфицирования продуктов убоя может быть содержимое кишечника при несоблюдении санитарных правил в технологическом процессе производства; мясопродуктов – выделениями грызунов (сальмонеллез, листериоз, псевдотуберкулез); возбудителями, обладающими высокой выживаемостью, - от объектов внешней среды, в частности почвы (сибирская язва, клостридиозы) или воды для обмывания туш, если она не отвечает требованиям к качеству питьевой воды. Особенно важно следить за микробиологической безопасностью при переработке животных на мясо в условиях мелких убойных пунктов. Источником заражения могут быть инвентарь, оборудование, руки работников мясоперерабатывающих предприятий, насекомые.

Большую опасность для здоровья людей представляет мясо животных с инфекционными заболеваниями. У таких животных микроорганизмы проникают во внутренние органы и ткани еще до убоя (прижизненное обсеменение). Эндогенное инфицирование возможно и у здоровых животных при ослаблении естественной резистентности организма под влиянием

голодания, утомления, перегревания или переохлаждения, травм и других неблагоприятных (стрессовых) факторов.

Мясо и мясопродукты представляют собой благоприятную среду не только для сохранения жизнеспособности микроорганизмов, но и в ряде случаев для их размножения и накопления.

Мясные продукты могут играть значительную роль в распространении инфекционных заболеваний у людей (табл.1).

Таблица 1. Заболевания бактериальной этиологии, передающиеся через мясо животных, птицы, яйца и продукты их переработки

Заболевание	Источник инфекции		
	животные	птица, яйца	человек
Сибирская язва	+		
Бруцеллез	+		
Лептоспироз	+		
Листерия	+	+	
Кокковые инфекции	+	+	+
Сальмонеллез	+	+	+
Колибактериоз	+	+	+
Кампилобактериоз	+	+	+
Туберкулез	+	+	+
Туляремия	+		
Ботулизм	+		
Клостридиозы	+	+	
Заболевания, вызванные условно патогенной микрофлорой	+	+	+
Дизентерия			+
Брюшной тиф			+
Холера			+
Псевдомоноз		+	

Мясо птицы (кур, уток, гусей, индеек, цесарок), производимое в частных хозяйствах, на птицекомбинатах, малых предприятиях, может быть обсеменено микроорганизмами прижизненно, во время транспортирования и убоя (особенно водоплавающей птицы). Наиболее интенсивная контаминация тушек птицы происходит в процессе убоя, тепловой обработки, при удалении оперения, потрошения и охлаждения. Установлено, что бактериальная обсемененность воды в шпарильных чанах и ваннах охлаждения увеличивается многократно (в 100 раз и более) за короткий промежуток времени. Превалирует сапрофитная микрофлора, обнаруживаются сальмонеллы, *Clostridium perfringens*, микроорганизмы рода *Campylobacter*. В

процессе потрошения и полупотрошения основная контаминация (БГКП, Proteus, Salmonella, C. perfringens) происходит при разрывах кишечника, желчного пузыря, яичных фолликулов.

Одним из значимых факторов передачи сальмонеллезом являются яйца (белок, желток). В ходе технологической обработки инфицированных яиц контаминации сальмонеллами подвергаются большие партии яичного порошка, меланжа и других яйцепродуктов. Через яйца и изготовленные из них продукты могут передаваться кокковые инфекции, туберкулез.

Важнейшим звеном в системе профилактических мероприятий по предупреждению заражения людей через потребляемое мясо, яйца и продукты их переработки, а также распространения инфекционных заболеваний среди животных является бактериологическое исследование, которое позволяет гарантировать санитарное благополучие продовольственного сырья, вырабатываемой из него продукции и выявить очаг инфекции.

ТЕМА 1. Общие правила отбора, консервирования и пересылки проб продуктов животного происхождения для микробиологических исследований с целью индикации возбудителей токсикоинфекций

Отбор проб

В зависимости от предполагаемого диагноза и характера патологоанатомических изменений в микробиологический или бактериологический отдел производственной лаборатории от каждой туши направляют пробы мышц, лимфатических узлов и внутренних органов:

- часть мышцы сгибателя или разгибателя передней и задней конечности туши, покрытую фасцией, длиной не менее 8 см или части другой мышцы размером не менее 8 x 6 x 6 см;

- лимфатические узлы от крупного рогатого скота — поверхностный шейный и наружный подвздошный вместе с окружающей их соединительной и жировой тканью; от свиней — поверхностный или шейный дорсальный либо

подкрыльцовый первого ребра, коленной складки и подчелюстной (один или два);

- долю печени с печеночным лимфатическим узлом или желчным пузырем, освобожденным от желчи, почку и селезенку (если для исследования отбирают часть печени, почки, селезенки, то поверхность разреза прижигают).

Для бактериологического исследования при подозрении на листериоз направляют головной мозг, долю печени и почку. При подозрении на сибирскую язву, эмкар, злокачественный отек на анализ направляют лимфатический узел пораженного органа или лимфатический узел, собирающий лимфу с места локализации подозрительного фокуса, отечную ткань, ухо, а у свиней, кроме того, обязательно — подчелюстной лимфатический узел. При подозрении на рожу свиней помимо проб мышц, лимфатических узлов и внутренних органов, в лабораторию направляют трубчатую кость.

Для исследования полутуш или четвертин туш берут кусок мышцы, лимфатические узлы и трубчатую кость. Для исследования соленого мяса, находящегося в бочках, отбирают пробы мышц и лимфатических узлов (из верхнего слоя, середины и со дна бочки), а также при наличии — трубчатую кость и рассол (около 500 см³).

При исследовании мяса мелких животных (кролики, нутрии) в лабораторию направляют целые тушки вместе с внутренними органами.

Для определения микробиологических показателей в соответствии с медико-биологическими требованиями (МБТ) № 5061-89 отбирают кусок мышцы без кости и жира массой 1000 г.

Следует учитывать, что никакая единичная проба, взятая от туши или другого большого куска мяса, не может быть представительной для продукта в целом. Однако и на целой туше или большом куске мяса проведение исследований невозможно. Поэтому способ взятия первичных или вторичных проб зависит от их назначения.

Единичные пробы с поверхности (например, для обнаружения БГКП или сальмонелл) отбирают путем обтирания всей поверхности (или выбранных участков) большими влажными тампонами или для проведения количественных микробиологических исследований путем разметки с помощью шаблона (трафарета) участков, из которых затем пробу вырезают, а для замороженного мяса соскабливают с поверхности.

Пробу мышц для микробиологического исследования (определение причин порчи мяса у кости) отбирают от пораженной части туши при помощи инструмента из нержавеющей стали для рассечения мышцы, из образцов замороженного мяса - с помощью терки. Единичные пробы, например, из замороженного мяса, упакованного под вакуумом, отбирают асептически с применением стерильных шприцев, колб и банок через фольгу либо после вскрывания упаковки.

Вторичную проб у отбирают от первичной, взятом для химического или микробиологического исследования, со стороны поверхности свежего среза с минимальным повреждением ткани.

Взятые пробы завертывают каждую в отдельности в пергамент или полиэтиленовую пленку и помещают в общий бумажный пакет, на котором ставят дату отбора образцов, номер туши, и направляют в лабораторию в общей таре.

В сопроводительном документе указывают:

- наименование продукта с указанием вида мяса, от которого взят образец и его количество:

- номера образцов;

- наименование и адрес предприятия или хозяйства, где отобран образец, эпизоотическое состояние данного предприятия или хозяйства по инфекционным заболеваниям;

- причину направления образцов на исследование;

- результаты предубойного осмотра животного, краткие патологоанатомические данные и предполагаемый диагноз:

- дату взятия образцов и подпись направившего их на исследование.

При отправке материала для бактериологического исследования в теплое время года или на дальние расстояния пробы рекомендуются законсервировать. С этой целью используют 30%-ный водный раствор глицерина или стерильное вазелиновое масло. Пробы можно обработать спиртом и обжечь на пламени горелки или перед упаковкой выдержать 30-40 сек в кипящей воде.

Отобранные пробы направляют на исследование в лабораторию непосредственно после отбора. Температура пробы должна соответствовать температуре хранения продукта. Пробы охлажденных продуктов транспортируют при температуре от 0 до 2⁰С, если исследование будет проведено в течение 24 ч. При температуре не выше -24⁰С, если исследование будет проводиться не ранее чем через 24 ч. Образцы для физического или органолептического анализа обычно не должны быть заморожены. При транспортировке образцов необходимо принять меры, предотвращающие воздействие прямых солнечных лучей на отобранные пробы.

Пробы должны быть доставлены в лабораторию в неповрежденном состоянии, без нарушения целостности упаковки и изоляции (пломбы, печати).

На мясоперерабатывающих предприятиях, убойных пунктах хозяйств тушу и другие продукты уоя в период после взятия проб и до получения результатов бактериологического анализа следует хранить в отдельных камерах при низкой положительной температуре (4-6⁰С). На рынках тушу и внутренние органы после взятия проб помещают в рыночный холодильничек-изолятор при температуре 0-4⁰С. До получения ответа о результатах исследования реализация мяса не разрешается, запрещено также возвращать тушу владельцу.

Пробы мяса, предназначенные для микробиологического анализа, исследуют непосредственно после поступления их в лабораторию. Если это невозможно, то их сразу после получения помещают в холодильник и исследуют в течение 24 ч. При более длительном сроке хранения образцы замораживают при -18⁰С.

ТЕМА 2. Бактериологическое исследование мяса сельскохозяйственных и промысловых животных

Материальное оснащение. Образцы мяса различной степени свежести. Предметные стекла, набор красок для окраски по Граму, пинцеты, ножницы, скальпель, спиртовки, микроскопы. Для бактериологического исследования мяса: петли, чашки с МПА, среды обогащения, селективные среды – Эндо, Левина, Плоскирева, ВСА. Специфические поливалентными и монорецепторные О- и Н-агглютинирующие сальмонеллезные сыворотки.

Бактериологическое исследование мяса и мясных продуктов проводят в соответствии с ГОСТ 21237-75 «Мясо. Методы бактериологического анализа» и другим нормативным документам, утвержденным Госэпиднадзором и Департаментом ветеринарии МСХ РФ.

Мышцы здоровых животных и птиц не содержат микроорганизмы. Загрязнение мяса микробами начинается в момент убоя. Кровь, вытекающая из артерий, отчасти засасывается вновь через вены, зияющие в ране и имеющие отрицательное давление. Обсеменение поверхности мяса происходит при снятии шкуры и разделке туши. Особенно **обильно загрязняется мясо**, если при обработке туши повреждают кишечник. Дальнейшее загрязнение поверхности мяса происходит при его транспортировке, при нарушении норм и правил хранения. Микроорганизмы, попавшие в мясо, при благоприятной температуре могут размножаться, поскольку этот продукт является хорошей питательной средой, а количество их на 1 см² поверхности мяса может достигать многих миллионов.

Гарантией доброкачественности и эпидемической безопасности мяса и мясных продуктов на этапе их продвижения от предприятия к потребителю является ветеринарный и санитарно-микробиологический контроль. Бактериологическое исследование мяса проводят во всех случаях предусмотренных НТД (научно-технической документацией), правилами ВСЭ и другими нормативными актами.

Бактериологическое исследование мяса и мясопродуктов проводят во всех случаях, предусмотренных правилами ветеринарно-санитарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов, а именно:

- во всех случаях вынужденного убоя животных, независимо от причин убоя;
- при желудочно-кишечных болезнях, при тяжело протекающих заболеваниях органов дыхания;
- микробиологическое исследование мяса проводят во всех случаях, когда предполагают обсеменение возбудителями зооантропонозов или пищевых токсикоинфекций и токсикозов;
- при удалении кишечника из туши позже двух часов после убоя животного;

На бактериологическое исследование должно быть направлено мясо, если невозможно определить пригодность его в пищу по результатам органолептического исследования, а также по ряду физико-химических показателей. При наличии обильного микробного обсеменения мяса установленного в результате микроскопии мазков-отпечатков, т.е. при сомнении в отношении пригодности мяса и невозможности определить пригодность его в пищу путем ветеринарно-санитарного осмотра.

Чаще на поверхности мясных туш находятся стафилококки и микрококки, молочнокислые бактерии, бактерии группы кишечных палочек, различные виды гнилостных аэробных бацилл и анаэробных клостридий, дрожжи и споры плесневых грибов.

Отбор проб. В зависимости от предполагаемого диагноза и характера патологоанатомических изменений в микробиологический отдел от каждой туши направляют пробы мышц, лимфатических узлов и внутренних органов:

Каждую пробу завертывают отдельно, помещают в общую упаковку, на которой ставят дату отбора образцов, номер туши. Тару с образцами опечатывают.

В сопроводительном документе указывают: вид и количество мяса, номера образцов, адрес хозяйства, причину исследования, дату и подпись направившего. Пробы охлажденных продуктов транспортируют при температуре от 0 до 2⁰С. Пробы мяса, предназначенные для микробиологического анализа, исследуют непосредственно после поступления их в лабораторию.

Микробиологический контроль мяса и мясопродуктов проводят для определения количества МАФАНМ, бактерий группы кишечных палочек, возбудителей зооантропонозов, обнаружение сальмонелл, палочки протей, токсичных стафилококков и патогенных анаэробов - в случае сомнений в отношении пригодности мяса и невозможности определить пригодность его в пищу путем ветеринарно-санитарного осмотра.

Исследование мяса состоит из следующих этапов:

1. Органолептическая оценка мяса.
2. Микроскопическое исследование препаратов, приготовленных из мяса, окрашенных по Граму, на капсулу и споры.
3. Первичный посев на МПА, МПБ, селективные и специальные среды, среды обогащения.
4. Идентификация выделенных культур по морфологическим, культурально-биохимическим и антигенным свойствам.
5. Заражение лабораторных животных в необходимых случаях.

Продолжительность бактериологического исследования мяса 3 суток, при постановке биопробы до 10 суток. Исследуемые туши после взятия проб помещают в холодильник-изолятор при температуре 0-4⁰С.

1. **Органолептическая оценка мяса.** Доброкачественное мясо при подсыхании образует корочку бледно-красного цвета. На разрезе оно плотное, эластичное, ямка после надавливания быстро исчезает. **Несвежее мясо** покрыто плотной, темно-красной или ослизненной корочкой. Консистенция его мягкая, несколько дряблая, образующаяся при надавливании ямка восстанавливается. Поверхность **испорченного мяса** ослизненная,

консистенция дряблая, мажущаяся; жир слизистый с прогорклым запахом – такое мясо бракуют.

2. Для **микроскопического исследования** мяса из каждой пробы готовят препараты-отпечатки для окрашивания по Граму, на наличие капсул - по Ольту или Михину. В каждом препарате изучают не менее 25 полей зрения.

Для приготовления препарата-отпечатка стерильными ножницами вырезают из середины каждого образца кусочек размером 1,5x2x2,5 см и прикладывают к предметному стеклу местом свежего среза. Делают по 3 отпечатка на 2-3 предметных стеклах. Мазки высушивают на воздухе или в струе теплого воздуха над пламенем горелки. Мазки можно фиксировать физическим или химическим методом. При химическом методе фиксации препараты погружают в метанол на 5 мин или на 15 мин в смесь Никифорова (равные объемы спирта и эфира), окрашивают по Граму и подсчитывают количество микроорганизмов в каждом поле зрения, учитывая отдельно шаровидные и палочковидные (табл.2).

Таблица 2. Оценка свежести мяса микроскопическим методом

Степень свежести мяса	pH мяса	Микроскопические показатели
1	2	3
Свежее	5,8-6,2	Единичные кокки или палочки; На стекле нет остатков ткани
Сомнительной свежести	6,3-6,5	До 20-30 кокков, единичные палочки. На стекле следы распада мышечной ткани
Несвежее, непригодное в пищу	6,7 и выше	Множество палочек, на стекле распавшаяся мышечная ткань

Мясо считается свежим, если в мазках-отпечатках не обнаружена микрофлора или в поле зрения препарата видны единичные (до 10 клеток) кокки и палочковидные бактерии и нет следов распада мышечной ткани.

Препарат-отпечаток из мяса сомнительной свежести окрашивается удовлетворительно, видны следы распада мышечной ткани, ядра мышечных

волокон в состоянии распада. При просмотре в каждом поле зрения обнаруживается не более 30 кокков или палочек.

Препарат-отпечаток из мяса непригодного в пищу, окрашивается хорошо. В поле зрения в препаратах, как из поверхностных, так и из глубинных слоев преобладают палочки. При сильном разложении мяса кокки почти отсутствуют, все поле зрения состоит из палочек. Среди них могут быть кишечные палочки, флуоресцирующие бактерии, спорообразующие бактерии. Из аэробных спорообразующих бактерий – *Bac.subtilis*, *Bac.mycoides*; из факультативно-анаэробных – *Proteus vulgaris*, из анаэробных - *Cl.putrificus*, *Cl.sporogenes*.

Определение количества МАФАНМ

Методика. Исследуемый образец мяса перед посевом освобождают от видимой жировой и соединительной ткани, погружают на 2-3 мин в этиловый спирт и обжигают поверхность. Затем стерильными ножницами из глубины различных мест каждого образца вырезают кусочки размером не менее 2,0x1,5x2,5 см. Лимфатические узлы разрезают пополам.

Все кусочки измельчают с соблюдением правил асептики, для посева составляют две пробы по 15 г каждая. Одна проба состоит из кусочков мышц и лимфатических узлов, а вторая - из кусочков паренхиматозных органов (печени, почки и селезенки).

Каждую пробу в отдельности помещают в стерильный стакан гомогенизатора, добавляют по 15 мл физиологического раствора и гомогенизируют в электрическом гомогенизаторе не более 2-3 мин (при этом 1 мл приготовленной взвеси содержит 0,5 мл продукта). При отсутствии гомогенизатора взвесь готовят в фарфоровых ступках, растирая пестиком измельченные ножницами образцы в течение 2-3 мин.

Полученные взвеси отстаивают 10 мин. Из верхней части надосадочной жидкости готовят ряд последовательных разведений 1:10, 1:100, 1:1000. 1 г мяса и по 1 мл из каждого разведения вносят параллельно в 2 чашки Петри, заливают расплавленным и охлажденным до 50⁰С МПА. Каждую чашку

тщательно и осторожно перемешивают, охлаждают, переворачивают вверх дном и инкубируют в термостате 24-48 ч при 30⁰С. Чтобы **определить количество мезофильных бактерий в 1 г мяса**, подсчитывают количество колоний в двух параллельных посевах, определяют среднеарифметическое число и умножают на степень разведения.

Для вычисления среднего арифметического нельзя использовать посевы, где количество выросших колоний на чашках менее 30.

- При отсутствии роста колоний результаты фиксируют, таким образом: «Количество микроорганизмов менее 1-го»

- Если оказалось, что при посеве из всех разведений на поверхности агара выросло менее 30 колоний, в результате анализа рекомендуется написать: «Рост единичных колоний при посеве (указать количество засеянного продукта)».

- Если на изучаемых чашках, более чем на половине их площади, имеется расплзающийся рост спорообразующих микроорганизмов, подсчет изолированных колоний невозможен, в результате анализа следует написать: «Рост спорообразующих микроорганизмов». Результаты исследований выражают в КОЕ - колониеобразующих единицах (мл,г).

Указанные методы подсчета колоний относятся ко всем продуктам и методам приведенным далее.

Чашки с первичными посевами на плотных питательных средах просматривают визуально, при необходимости – через лупу. Обращают внимание на колонии характерные для возбудителей сибирской язвы, рожи свиней, пастереллеза, листериоза, кокковых инфекций, а также напоминающих рост микроорганизмов, вызывающих пищевые отравления у людей.

Мясо оценивают в соответствии с Санитарными правилами и нормами (СанПиН), в 1 г парного мяса допускается не более 10 КОЕ/г МАФАНМ (колонии образующих единиц), в охлажденных и переохлажденных отрубках не более 1000 КОЕ/г МАФАНМ.

Индикация кишечной палочки.

Для выявления наличия БГКП в определенной навеске мяса, готовят исходное и ряд 10-кратных разведений на физрастворе с таким расчетом, чтобы в посевах на плотных питательных средах получить изолированные колонии. Затем по 1 мл различных разведений вносят в жидкие селективные питательные среды (бульон лактозный с бриллиантовым зеленым и желчью или в среду Кесслера). Посевы выдерживают в термостате при 37⁰, предварительный учет проводят через 24 ч, окончательный – через 48 ч по интенсивному росту микроорганизмов, признаками которого являются помутнение среды, образование газа, изменение цвета индикатора (в результате подкисления pH).

Для подтверждения принадлежности микроорганизмов к БГКП проводят высев 0,1 мл культуральной жидкости на одну из дифференциально-диагностических сред (Эндо, Смирнова). Инкубируют в термостате в течение 24 ч. На агаре Эндо они образуют красные колонии с металлическим блеском (и без), на среде Смирнова – желтые колонии с изменением среды в тот же цвет. Для более быстрого получения результатов разрешено проводить первичный посев 0,1 мл исходного или 10-кратного разведения непосредственно на плотные питательные среды, что позволяет сделать заключение о наличии (отсутствии) БГКП в определенной навеске продукта через 24 ч. Для этого отбирают чашки с посевами, на которых выросло от 15 до 150 характерных колоний. Не менее чем из пяти колоний готовят мазки, окрашивают по Граму, изучают морфологические и тинкториальные свойства.

Одновременно с изучением морфологических, культуральных, ферментативных свойств, проводят серологическую типизацию культур эшерихий. Серологическую типизацию культур эшерихий проводят при помощи набора типоспецифических агглютинирующих O-копи сывороток. По классификации, утвержденной Международным номенклатурным комитетом в 1964 г, род эшерихий представлен одним видом *E.coli*, который насчитывает около 160 сероваров.

В 1 г парного мяса в соответствии с Санитарными правилами и нормами, бактерии группы кишечной палочки не допускаются.

При идентификации выделенных культур следует иметь в виду, что эшерихии – грамотрицательные палочки, спор и капсул не образуют, подвижны, ферментируют лактозу и маннит, не разжижают желатин, не выделяют сероводород и образуют индол, не утилизируют цитраты и не растут на среде Симмонса, дают положительную реакцию с метиловым красным и отрицательную – Фогеса-Проскауэра, не расщепляют мочевины.

Индикация сальмонеллезной палочки.

На основании результатов анализа определяют наличие (отсутствие) сальмонелл и их количество в навеске продукта массой 25 г. Для этого готовят измельченную навеску продукта массой 25 г, вносят ее в колбу с 225 мл среды обогащения (селенитовый бульон, тетратионатная среда) с последующим выдерживанием в термостате соответственно при 37⁰С или 42⁰С в течение 24-48 ч.

Следует иметь в виду, что на селенитовом Ф-бульоне *S.typhi suis* и *S.cholerae suis*, как правило, не растут. *S.cholerae suis* растет лучше на среде Киллиана.

При появлении роста на средах обогащения, из них делают пересев на плотные селективно-диагностические среды в чашках Петри (агар Эндо, Левина, ВСА) по секторам для получения изолированных колоний. Посевы выдерживают в термостате 24 ч при 37⁰С, исследуют на наличие колоний, по своим характеристикам подозрительных на сальмонеллы.

Сальмонеллы, как не ферментирующие лактозу микроорганизмы, в подавляющем большинстве случаев дают типичный рост на дифференциально-диагностических средах:

- на Эндо (фуксин сульфитный агар) – круглые, бесцветные колонии;
- на среде Левина – прозрачные, нежно-розовые колонии;
- на среде Смирнова – прозрачные, серовато-фиолетовые колонии:

- среде Плоскирева – бесцветные колонии, но более плотные и меньшего размера, чем на среде Эндо.

- на висмут-сульфитном агаре (ВСА), который применяется для **целенаправленного выделения сальмонелл**, - как правило, черные или коричневые колонии с характерным металлическим блеском. При этом наблюдается прокрашивание в черный цвет участка среды. Исключение составляют некоторые серологические типы из группы С, в частности *S.typhisuis*, растущие на ВСА в виде светло-зеленых колоний.

Из подозрительных на сальмонеллы колоний готовят мазки, окрашивают по Граму, изучают культуральные и ферментативные свойства. У всех подозрительных культур определяют антигенную структуру, устанавливают род и идентифицируют до вида.

Сальмонеллы – грамотрицательные палочки, подвижные, за исключением *S.pullorum-gallinarum*, не ферментируют лактозу и сахарозу, расщепляют глюкозу и манит, выделяют сероводород, не образуют индол.

В заключении указывают, обнаружены или отсутствуют сальмонеллы в 25 г исследуемого мяса.

В таблице 3 представлены микробиологические показатели мяса и мясопродуктов.

Таблица 3. Микробиологические показатели мяса и мясопродуктов

Группа продуктов	МАФАНМ КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускают наличие бактерий		
		БГКП	СРК	Патогенные МО, в т.ч. сальмонеллы
Мясо свежее (все виды убойных животных)				
-Парное в отрубях полутуши, четвертины)	10	1,0	-	25
-Охлажденное и пере- охлажденное в отрубях	1:10 ³	0,1	-	25
Мясо замороженное (все виды убойных животных)				
-В отрубях (полутуши)	1· 10 ⁴	0,01	-	25
-Блоки из жированного мяса (говядина, свинина, баранина.)	5·10 ⁵	0,001	-	25

1	2	3	4	5
Полуфабрикаты мясные натуральные				
Фарш свежий	$5 \cdot 10^6$	0,001	-	25
Субпродукты убойных животных (охлажденные, замороженные)				
Печень, почки, язык, мозги, сердце	-	-	-	25

Качество мяса и мясопродуктов после проведения микробиологического анализа оценивают в соответствии с Санитарными правилами и нормами (СанПиН), по которым в 25 г мяса не допускается присутствие патогенных бактерий, в т.ч. сальмонелл и листерий.

Обеззараживание условно годного мяса. Обеззараживанию подлежат мясо и мясопродукты, которые не могут быть выпущены без предварительной обработки. Мясо и мясопродукты, подлежащие обеззараживанию провариванием, варят кусками массой не более 2 кг и толщиной до 8 см в открытых котлах в течение 3 часов, а в закрытых котлах – при 112°C в течение 2,5 часов. Мясо считается обеззараженным, если в толще куска температура достигла 80°C .

Во всех случаях, когда перерабатывают мясо, подлежащее обеззараживанию, по окончании работы тщательно дезинфицируют помещение, оборудование и тару. Аппаратуру, использованную при переработке мяса, промывают горячим 5%-ным раствором соды кальцинированной или другими препаратами согласно действующим инструкциям.

Задания для самостоятельной работы студентов

1. Приготовить препарат-отпечаток из исследуемого мяса, окрасить по Граму, изучить под иммерсионным объективом, оценить качество мяса.

2. Сделать посев исследуемого мяса в МПА, на агар Эндо, Левина и Плоскирева.

3. На следующем занятии изучить культуральные свойства колоний, появившихся после посева. Обратить внимание на колонии характерные по культуральным свойствам на возбудителя сибирской язвы, рожи свиней, листериоза, возбудителей кокковых инфекций.

4. На следующем занятии провести идентификацию колоний типичных для сальмонелл, путем постановки РА на предметном стекле с поливалентными О- и Н- агглютинирующими сальмонеллезными сыворотками.

ТЕМА 3. Бактериологическое исследование мяса птиц

Материальное оснащение. Тушки или окорочка куриного мяса, скальпели, пинцеты. Весы. Спиртовки, стерильный физраствор в колбах по 500 мл и в пробирках по 9 мл, стерильные пипетки на 1,2 мл. Бактериологические петли, набор красок для окраски по Граму, предметные стекла, микроскопы, иммерсионное масло. Питательные среды: МПА, агар Эндо и Левина, ВСА в чашках Петри.

Бактериологическое исследование мяса птицы регламентировано ГОСТ-ом. Подготовку проб к исследованию проводят общепринятыми методами по ГОСТ 26668-85 ГОСТ 26669-85 и дополнениями по ГОСТ Р 50396.0 – 92. Количество МАФАНМ определяют в соответствии с ГОСТ Р 50396.1 – 92 и ГОСТ 7702.2.1-95

Для анализа мяса здоровой птицы от партии отбирают не менее трех тушек. Каждую тушку в отдельности упаковывают в полиэтиленовую пленку или пергаментную бумагу, печатают и составляют акт с указанием наименования предприятия, вида птицы, размер партии и другие данные. С момента отбора и до начала исследования образцы хранят при температуре 0-2⁰С не более 24 ч.

Отбор проб от каждой тушки проводят одним из трех методов:

- методом вырезания кусочков мышц из различных участков;

- методом смыва со всей поверхности тушки смывной стерильной водой;
- методом смыва с поверхности тушки тампоном.

Метод вырезания кусочков мышц используют для выявления сальмонелл, а также для определения других микробиологических показателей тушки. Из области грудной части, голени и бедра вырезают на всю глубину мышцы в равных количествах. Масса отобранной пробы должна быть 100-150 г. Всю пробу измельчают ножницами с соблюдением правил асептики, растирают в фарфоровой ступке пестиком, перемешивают и получают объединенную пробу одной тушки или полутушки. 25 г продукта используют для исследования на сальмонеллы, а 10 г продукта - для приготовления серии десятикратных разведений для определения МАФАнМ.

Для оценки санитарного состояния производства используют **метод смыва со всей поверхности тушки** смывной стерильной водой и **метод смыва тампоном**. В смывах определяют МАФАнМ, споры клостридий и бацилл, а также другие микроорганизмы по показаниям производства (наличие сальмонелл в смывах не определяют).

Отбор проб **методом смыва** со всей тушки проводят следующим образом: тушку массой не более 1,5 кг помещают в стерильный пакет из полимерных материалов, наливают стерильную воду в количестве равном массе тушки (т.е. 1500 мл), встряхивают содержимое пакета в течение 2 минут. Полученная смывная жидкость служит исходным материалом, из которого готовят серию десятикратных разведений.

Отбор проб методом смыва стерильным тампоном применим к потрошеным тушкам любой массы. Смыв осуществляют с разных участков.

С тушек крупной птицы общая площадь смывной поверхности должна составлять 100 см² (по трафарету), смыв проводят 2-5 тампонами, которые помещают в колбу со 100 мл стерильной жидкости и встряхивают в течение 2 минут. Полученная смывная жидкость служит исходным материалом для приготовления последовательных десятикратных разведений. Расчет количества микроорганизмов проводят на 1 см² поверхности тушки.

Отбор проб потрохов и бескостного кускового мяса проводят следующим методом: от партии продукта каждого наименования отбирают точечные пробы (по 10-50 г), среднюю пробу массой не менее 150 г помещают в стерильную посуду. Измельчают, тщательно перемешивают и взвешивают навеску 25 г для посева на сальмонеллы и 10 г для приготовления десятикратных разведений (для приготовления первого разведения к 10 г измельченной массы добавляют 90 мл стерильной воды).

При микробиологическом исследовании мышечных желудков и кускового мяса, кроме выделения сальмонелл, рекомендуется отбор проб методом смыва в полимерном пакете. Для этого среднюю пробу продукта одного наименования массой не менее 150 г помещают в новый пакет, взвешивают и добавляют стерильную смывную воду в количестве равном массе пробы. Встряхивают 2 мин и 1 мл смывной жидкости используют для серии последовательных десятикратных разведений.

Расчет количества микроорганизмов определяют в 1 г продукта или в 1 мл смывной жидкости по массе равной массе пробы продукта.

Для выделения микроорганизмов из мяса птицы, субпродуктов и полуфабрикатов используют верхний слой надосадочной жидкости, а для определения их количества – используют взвесь исходного разведения.

Микробиологический анализ проводят на наличие мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФАНМ), бактерий группы кишечных палочек (БГКП), сальмонелл, сульфатредуцирующих клостридий (СРК), протей, золотистого стафилококка, микробиологические показатели, по которым для птицеводческой продукции регламентированы СанПиН (Санитарные правила и нормы).

Методика определения количества МАФАНМ методом смыва со всей тушки проводят следующим образом: тушку массой не более 1,5 кг помещают в стерильный пакет из полимерных материалов, наливают стерильную воду в количестве равном массе тушки (т.е. 1500 мл), встряхивают содержимое пакета в течение 2 минут. Полученная смывная жидкость служит

исходным материалом, из которого готовят серию десятикратных разведений по общепринятой методике, для определения количества МАФАНМ в 1 мл смыва. Из соответствующих разведений делают посев по 1 мл одновременно в две чашки Петри, заливают 15 мл расплавленного, охлажденного до 50⁰С МПА с глюкозой. Питательную среду тщательно размешивают круговыми движениями чашки по поверхности стола для равномерного распределения посевного материала и получения изолированных колоний. Чашки с посевами ставят в термостат вверх дном, чтобы предотвратить размывание выросших колоний конденсатом, образующимся на внутренней поверхности крышки, выдерживают в термостате при 30⁰С в течение 72 ч.

Результаты оценивают по каждой пробе отдельно. При этом подсчитывают все выросшие колонии, учитывают чашки, в которых количество колоний составляет 30-300. По результатам подсчета вычисляют среднее арифметическое значение количества колоний из всех посевов одного разведения.

Количество микроорганизмов в 1 г продукта или 1 мл смывной жидкости определяют по формуле:

$$X = a \cdot 10^n \frac{(m + V)}{m \cdot V}, \text{ где:}$$

a – среднее арифметическое количество колоний в посевах;

n – число 10-кратных разведений навески продукта;

m – масса (объем) навески продукта (смыва), взятая для приготовления исходного разведения (г или мл);

V – объем жидкости, взятый для приготовления исходного разведения навески продукта (смыва), г или мл.

Количество микроорганизмов на 1 см² поверхности продукта определяют по формуле:

$$X_1 = a \cdot 10^n \frac{V}{\dots}, \text{ где:}$$

$$S \cdot V_1$$

S – общая площадь анализируемой поверхности в см²;

V_1 - объем инокулята, внесенного в чашку Петри, мл.

Результаты вычисления количества микроорганизмов в 1 г продукта (в 1 мл смыва с продукта смывной жидкостью или на 1 см² поверхности продукта при смыве тампоном) выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ) от 1,0 до 9,9, умноженным на 10ⁿ степень разведения).

При показателе МАФАНМ более $1,0 \times 10^7$ КОЕ/г и **при отсутствии признаков органолептической порчи**, перечисленные выше продукты не подлежат хранению в охлажденном состоянии. Их срочно отправляют на изготовление термически обработанных продуктов или на заморозку. Реализация их в охлажденном состоянии возможна в течение 4-6 часов.

Партию продукта с показателем МАФАНМ более $1,0 \times 10^7$ КОЕ/г и **признаками органолептической порчи направляют на утилизацию. В соответствии с Санитарными правилами и нормами количество МАФАНМ в 1 г охлажденного и замороженного мяса птицы не должно превышать 100000 КОЕ/г.**

Индикация БГКП в мясе птицы

Индикация и определение количества бактерий группы кишечных палочек в мясе птицы основана на высеве определенного количества продукта в жидкие селективные лактозосодержащие среды (среду Кесслера), выращивание посевов при 37⁰С в течение 48 часов, подтверждении принадлежности выросших микроорганизмов по сбраживанию лактозы с образованием кислоты и газа и морфологическим признакам к БГКП.

Заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к БГКП, дают на основании выявления в посевах грамтрицательных, не образующих спор палочек, сбраживающих лактозу до кислоты и газа при температуре 37⁰С, указывая навеску продукта (в г), объем (в мл) или площадь смыва (в см²).

Индикация сальмонелл

Индикация сальмонелл в мясе птицы основана на высеве определенного количества продукта (или смывов с его поверхности) на жидкие селективные питательные среды с выделением чистых культур на дифференциально-диагностических средах, изучении морфологических и культурально-биохимических признаков сальмонелл, с дальнейшей их серологической типизацией (идентификацией).

Методика: Берут навеску продукта 25 г (или смыв не менее 25 см³) и высевают в пептонно-буферную воду в соотношении 1:5. Просевы инкубируют 24 ч при температуре 37⁰С. Затем 10 мл культуральной жидкости из пептонно-буферной воды пересевают в 90 мл одной из сред обогащения (Мюллера, Кауфмана, селенитовую, магниевую) и инкубируют в термостате при 37⁰С. Через 24 и 48 ч из среды обогащения делают пересев на две любые дифференциальные среды (Эндо, Левина, ВСА и др.) по выбору и инкубируют в термостате 24 ч, а, если это ВСА, то - 48 часов.

При отсутствии подозрительных колоний на дифференциальных средах работу с посевами прекращают. Подозрительные колонии используют в дальнейших исследованиях, для этого отбирают не менее 5 типичных колоний. Изучают морфологические, тинкториальные, культуральные и ферментативные свойства: определяют способность расщеплять лактозу, глюкозу, сахарозу, манит, мочевины; образование сероводорода и индола, ацетилметилкарбинола (реакция Фогеса-Проскауэра), утилизацию цитрата. **К бактериям рода сальмонелла относят культуры, не ферментирующие лактозу, сахарозу, расщепляющие глюкозу и манит, образующие сероводород и не образующие индол, утилизирующие цитрат и не расщепляющие мочевины.**

При обнаружении сальмонелл в партиях тушек птицы, в партиях бескостного кускового мяса – вся партия должна быть направлена на изготовление консервов в соответствии с Правилами ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарной экспертизы мяса и мясных продуктов.

Результаты исследований записывают следующим образом: сальмонеллы обнаружены или не обнаружены в 25 г продукта (или в смыве продукта с указанием исследуемой площади в см²).

Выявление золотистого стафилококка

Индикация стафилококка в мясе птицы основана на высеве навески мяса (смывов с его поверхности или их разведений) на элективные питательные среды с повышенным содержанием натрия хлорида или добавлением лития хлорида и принадлежности, выросших микроорганизмов к *Staph.aureus* по морфологическим, культурально-ферментативным свойствам и коагуляции плазмы крови кролика.

Для выявления стафилококка в мясе птицы 1 г продукта измельчают, готовят исходное и ряд десятикратных разведений до 1:100. Из всех разведений делают посев по 1 мл в солевой бульон в соотношении к питательной среде 1:9. При выделении стафилококка из 1 г продукта используют 10 мл его первого разведения. При появлении роста в солевой среде, делают посев на поверхность агара Байрда-Паркера, яично-желточно-солевой или яично-желточный азидный агар. Посевы на агаризированных средах просматривают после 18-24 ч инкубирования при температуре 37⁰С. На среде Байрда-Паркера стафилококки растут в виде черных блестящих выпуклых колоний диаметром 1-2 мм, окруженных зоной лецитиназной активности в виде кольца шириной 1-3 мм. На яично-желточном солевом и азидном агарах стафилококки растут в виде колоний различных оттенков желтого цвета, окруженных зоной лецитиназной активности.

Для подтверждения принадлежности обнаруженных микроорганизмов к стафилококкам изучают морфологические, тинкториальные свойства не менее чем из 5-ти колоний. Устанавливают способность ее коагулировать плазму крови кролика.

При обнаружении стафилококков дают заключение о наличии *Staph.aureus* в исследуемой пробе продукта с указанием массы навески (в г), площади (в см²) или смыва (в мл).

При проведении бактериологического анализа на выявление в пробах стафилококков следует обратить внимание на возможное присутствие в них стрептококков, которые на МПА образуют мелкие круглые плоские колонии, вначале прозрачные, затем мутнеющие.

В таблице 4 представлены микробиологические показатели мяса и субпродуктов из птицы.

Таблица 4. Микробиологические показатели мяса птицы

Группа продуктов	МАФАН КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются следующие виды бактерий			
		БГКП	СРК	S.aureus	Патогенные МО, в т.ч. сальмонелл
1	2	3	4	5	6
1. Птица охлажденная замороженная	$1 \cdot 10^5$	-	-	-	-
2. Мясо птицы бескостное, кусковое, окорока	$2 \cdot 10^5$	-	-	-	25
3. Потроха (печень, мышечные желудки, сердце)	$1 \cdot 10^6$	-	-	-	25

Задания для лабораторной работы

1. Приготовить препарат-отпечаток из исследуемого мяса кур, окрасить по Граму, изучить под иммерсионным объективом, оценить качество мяса.

2. Сделать посев исследуемого куриного мяса в МПА, на агар Эндо, Левина и Плоскирева в чашках Петри.

3. На следующем занятии изучить культуральные свойства колоний, появившихся после посева. Обратить внимание на колонии похожие по культуральным свойствам на возбудителей рожи свиней, листериоза, возбудителей кокковых инфекций.

4. На следующем занятии провести идентификацию колоний типичных для бактерий рода Сальмонелла, путем постановки РА на предметном стекле с поливалентными, Н- и О-агглютинирующими сальмонеллезными сыворотками.

ТЕМА 4. Бактериологическое исследование мясных консервов и сырья для изготовления колбас, фарша и других видов мясной продукции

Материальное оснащение. Образцы исследуемых консервных банок. Питательные среды: горячий МПА столбиком, среда Вильсон-Блера в пробирках высоким столбиком, чашки Петри с агаром Эндо, Левина, Плоскирева, Смирнова. Стерильный физраствор в колбах по 300 мл и по 9 мл в пробирках, стаканы с делениями, мензурки, стерильные пипетки на 1 мл, 10 мл; среды обогащения и накопления для сальмонелл. Ступки с пестиком, ножницы, скальпели, пинцеты, спирт для обжигания, спиртовки, бактериологические петли, банки с дезраствором, чашки Петри со стеклянной пластинкой 6х6 см внутри чашки положенной на 2 спички для посева по Перетцу, пустые стерильные пробирки.

Бактериологическое исследование мясных и мясорастительных консервов. Отбор проб проводят в соответствии с требованиями ГОСТ 26668-85 и ГОСТ 51446-99. Промышленную стерильность консервов оценивают по ГОСТу 30425-97.

Консервы – пищевые продукты, предназначенные для длительного хранения, специально обработанные и герметично упакованные в тару, которая защищает их от проникновения микроорганизмов во время хранения и транспортировки.

Основным сырьем для выработки мясных баночных консервов служит мясо животных и субпродукты, которые всегда в той или иной степени обсеменены различными сапрофитными микробами, в том числе возбудителями порчи консервов (анаэробными клостридиями и термофильными бациллами), а иногда и токсигенными и патогенными микроорганизмами (токсигенные стафилококки, сальмонеллы и др.). Для выработки мясных консервов можно использовать мясо и субпродукты только от здоровых и упитанных животных. Нельзя применять сырье плохо

обескровленное, загрязненное, дважды замороженное, условно годное. Степень обсеменения подготавливаемого сырья микроорганизмами находится в прямой зависимости от санитарно-гигиенических условий производства. При этом источниками обсеменения могут быть руки рабочих или оборудование, а также вспомогательные материалы (пряности, соль, сахар, жир-сырец), которые всегда содержат микроорганизмы.

Стерилизация консервов – заключительный этап технологического процесса консервирования. Под стерилизацией подразумевается различная степень нагревания продукта, приводящая к получению микробиологически стабильного консервированного продукта, не содержащего микроорганизмы, способные развиваться в нем при хранении в определенных температурных условиях. Основная цель стерилизации консервов – уничтожение патогенных и токсигенных микроорганизмов, способных вызывать порчу продукта. Режим стерилизации устанавливают в зависимости от вида консервов, для мясных консервов это 112-120⁰С. Однако, несмотря на воздействие высоких температур, в консервах могут сохраняться жизнеспособные микробные клетки, т.е. не всегда достигается полная стерилизация всех банок.

Эффективность стерилизации консервов зависит не только от продолжительности и температуры нагревания, но и количественного состава микрофлоры, рН среды, содержания в нем жира, поваренной соли и сахара.

Споры различных видов спорообразующих микроорганизмов обладают неодинаковой устойчивостью к высоким температурам. Так, споры многих мезофильных аэробных бацилл отмирают уже при 100⁰С, тогда как споры *Bac. subtilis* могут сохранять жизнеспособность при 130⁰С. Споры анаэробных микроорганизмов отмирают при высоких температурах медленнее, чем споры аэробов.

В большой степени на результаты стерилизации влияет количественный состав микрофлоры, чем выше **начальная микробная обсемененность** консервов, тем больше времени требуется для полного уничтожения микроорганизмов и тем больше их может выжить при

нагревании. Кислая среда ускоряет коагуляцию белков и отмирание микроорганизмов, а также вызывает снижение термоустойчивости вегетативных клеток и их спор.

Микроорганизмы, которые в процессе стерилизации консервов, сохранили свою жизнеспособность, принято называть остаточной микрофлорой. Состав остаточной микрофлоры стерилизованных консервов, как правило, представлен споровыми микроорганизмами. Наличие в готовых консервах жизнеспособных клеток бесспорных бактерий всегда указывает на **нарушение температурного режима**, в результате которого стерилизация оказалась недостаточной. В таких случаях кроме спорообразующих микробов в консервах обнаруживают стафилококки, кишечную палочку и протей.

В соответствии с положением о порядке санитарно-технического контроля на производственных предприятиях, в розничной торговле и на предприятиях общественного питания все консервы в зависимости от состава сырья, термической обработки и величины рН подразделяют на 6 групп - (А, Б, В, Г, Д, Е):

группа А – полные консервы: консервы из говядины, свинины, конины, мяса птицы с растительными наполнителями или без них, простерилизованные в автоклавах при 110-120⁰С, со сроком хранения от 9 месяцев до 2 лет при температуре не выше 30⁰С.

группа Д - полуконсервы (ветчина, бекон, сосиски) стерилизованные при 100-110⁰С. Их безопасность и сохранность гарантируются при хранении при температуре от 2 до 15⁰С.

группы Б, В, Г, Е – растительные консервы (овощи, фрукты, плодово-ягодные компоты, соки).

Особая группа консервов - **пресервы** – пастеризованные консервы производят из говядины, свинины, мяса птицы, рыбы, которые подвергают тепловой обработке при температуре не выше 100⁰С, а в случае асептического консервирования – при 130⁰С. Сохранность таких консервов гарантируется хранением при температуре не выше 5⁰С.

Правила отбора проб.

Для контроля качества консервов от партии отбирается три единицы потребительской тары для продукции вместимостью до 1 л включительно и одна единица, если вместимость - больше 1 л. Образцы консервных банок направляют в лабораторию с сопроводительным документом, в котором указывается дата и показатели, которые должны быть определены, размеры партии, от которой отобран средний образец, сорт и дата выработки продукта, должность и фамилия лиц, отобравших образец.

Доставленные образцы осматривают и проверяют герметичность по следующей методике. Банки освобождают от этикеток, помещают в один ряд в предварительно нагретую до кипения воду, воду берут в 4-кратном количестве по отношению к массе банок. Слой воды над банками должен быть не менее 3 см. Появление струйки пузырьков указывает на негерметичность. Банки выдерживают не менее 5-7 мин, сначала на дне, потом переворачивают на крышку. Для бактериологического исследования отбирают только герметичные банки.

В зависимости от явных и скрытых дефектов различают физический, химический и микробиологический брак. Дефектами внешнего вида тары с фасованной в нее продукцией считают видимые невооруженным глазом признаки не герметичности – пробоины, подтеки или следы продукта, вытекающего из банки, а также бомбаж – вздутие консервной банки. К дефектам консервированного продукта относятся видимые невооруженным глазом признаки развития микроорганизмов, такие как брожение, заплесневение.

Перед микробиологическим анализом банки подвергают термостатированию, но только герметично укупоренные, бездефектные по внешнему виду, предназначенные для определения промышленной стерильности. Консервы, предназначенные для выявления ботулинических токсинов, бомбажные, с признаками микробиологической порчи и негерметичные, термостатированию не подлежат.

Для проявления жизнедеятельности МАФАНМ консервы термостатируют при 30-37⁰С в таре до 1 л включительно, не менее 5 суток, а свыше 1 л – не менее 7 суток. Для термофильных микроорганизмов – термостатируют в любой таре не менее 3 суток. Ежедневно консервы осматривают. При появлении дефектов банки удаляют из термостата, выдерживают при комнатной температуре 24 часа и, если консервы принимают прежний вид, то их считают бездефектными и продолжают термостатирование. По истечении времени инкубирования консервы извлекают из термостата и оставляют при комнатной температуре на сутки. Отмечают дефекты тары видимые невооруженным глазом, признаки развития микроорганизмов в самом продукте в стеклянных банках (брожение, плесневение), в металлической таре - бомбаж.

Подготовка к микробиологическому исследованию.

Банки тщательно моют теплой водой и вытирают. Затем крышку банки протирают смоченным в спирте тампоном, фламбируют и вскрывают консервным ножом. Проводят органолептическое исследование: определяют внешний вид, цвет, запах и состояние содержимого. Органолептические признаки специфичны для каждого вида консервов, они должны отвечать требованиям стандартов и технических условий.

Из каждой консервной банки отбирают одну или несколько навесок, предназначенных для непосредственного посева и приготовления последовательных разведений для проведения всех видов исследования. Навеску для посева отбирают **весовым или объемным методом** после вскрытия банки консервов **в условиях исключающих микробное загрязнение**, в образце должны быть представлены все компоненты и в том же соотношении, что и в продукте.

Стерильность консервов определяют в случаях, когда они выработаны по специальным заказам и для поставок экспедициям, космонавтике и лечебным учреждениям.

Под стерильностью консервов понимают отсутствие жизнеспособных микроорганизмов в консервированном продукте.

При определении **стерильности** консервов 1 мл (г) исходного **продукта без разведения** вносят в чашку Петри, заливают расплавленным и охлажденным до 50⁰С МПА, тщательно перемешивают содержимое чашки, охлаждают и ставят в термостат при 37⁰С. Через \dots на 72 ч. подсчитывают количество выросших колоний и определяют количество микроорганизмов в 1 см³ или в 1 г продукта.

Определение промышленной стерильности.

При определении промышленной стерильности в каждой упаковочной единице устанавливают **присутствие или отсутствие тех микроорганизмов, показатели которых оговариваются в нормативном документе.** Поэтому при выработке различных видов консервов ориентируются обычно на консервированный продукт, соответствующий требованиям *промышленной стерильности.* В консервированном продукте *промышленной стерильности* допускается присутствие только ограниченного числа видов спорообразующих микроорганизмов. В нем должны отсутствовать микроорганизмы и токсины микробного происхождения, опасные для здоровья людей, а также микроорганизмы, способные развиваться и вызывать порчу продукта при температуре хранения, установленной для данного вида консервов (для потребителя температура указана на этикетке).

Из пробы консервированного продукта, подготовленного для анализа, готовят исходное и ряд 10-кратных разведений на физрастворе, обычно готовят разведения до 10⁴. Из каждого разведения по 1 мл вносят в чашки Петри, заливают горячим, охлажденным до 50⁰С МПА, термостатируют 24 ч. при 37⁰С, подсчитывают количество колоний. Расчет ведут по формуле:

$$(1) \quad X = \frac{A \cdot 10^n (V_{\text{пр}} + V_{\text{вод}})}{V_{\text{пр}} \cdot q}$$

Где: а – количество колоний на поверхности среды в чашке;

п – степень разведения продукта при приготовлении разведений;

$V_{\text{вод}}$ - объем воды, использованный для приготовления пробы;

$V_{\text{пр}}$ - объем продукта, использованного для приготовления пробы;

q - объем посевного материала, внесенного в чашку Петри.

При анализе сливов с продукта расчет ведут по формуле:

$$(2) \quad X = \frac{a \cdot 10^n \cdot V_{\text{вод}}}{V_{\text{пр}} \cdot q}$$

Из параллельных посевов определяют среднеарифметическое число колоний на чашках, умножают его на соответствующее разведение и находят количество микроорганизмов в 1 мл или 1 г продукта по формуле (1). При анализе сливов с продукта расчет ведут по формуле (2).

После подсчета колоний определяют родовую и видовую принадлежность выделенного микроба.

В нормативном документе на промышленно-стерильные консервы регламентированы видовой состав и допустимое количество микроорганизмов, а также внешний вид, результаты микроскопии и значение рН. Если хотя бы в одном из посевов обнаружены мезофильные клостридии *Cl.botulinum* и (или) *Cl.perfringens*, консервы оценивают как не отвечающие требованиям промышленной стерильности.

Для индикации и определения БГКП предусматривают установление наличия БГКП в определенной навеске продукта и подсчет их количества. По микробиологическим нормативам не допускается наличие БГКП в 1 г консервированного мяса.

Методика. Для индикации БГКП проводят посев по 1 г натурального продукта и из разведений 1:10, 1:100 в среду Кесслера. Посевы культивируют 24 ч в термостате при 37⁰С, предварительный учет проводят через 24 ч,

окончательный – через 48 ч. При отсутствии признаков роста делают заключение об отсутствии БГКП в исследуемом продукте

При появлении роста, признаками которого являются помутнение среды, образование газа, изменение цвета среды, проводят дальнейшие исследования. Для подтверждения принадлежности микроорганизмов к бактериям группы кишечной палочки, из проросших пробирок делают высев 0,1 мл культуральной жидкости на одну из дифференциально-диагностических сред – агар Эндо или агар Смирнова (характерно появление желтых колоний). Посевы инкубируют в термостате при 37⁰С в течение 24 ч. Из изолированных колоний по своим культуральным признакам характерных для кишечной палочки делают препараты, окрашивают по Граму, изучают тинкториальные и морфологические признаки.

В некоторых случаях можно проводить первичный посев 0,1 мл исходного продукта или из 10-кратного разведения непосредственно на поверхность дифференциально-диагностических сред (Эндо), что позволит дать заключение о наличии (или отсутствии) БГКП в определенной навеске продукта уже через 24 часа. Не менее чем в 5-ти колониях изучают морфологию микроорганизмов в мазках, окрашенных по Граму.

Обнаружение коротких с закругленными концами грамотрицательных палочек, специфически изменяющих цвет жидких дифференциально-диагностических сред и образующих характерные колонии на элективных средах с лактозой, указывает на наличие БГКП.

В заключении указывают, обнаружены или отсутствуют БГКП в 1 г исследуемого продукта.

Индикация сальмонелл в связи с тем, что они присутствуют в консервах в небольшом количестве, проводится в четыре этапа:

- предварительное обогащение – выдерживание пробы в термостате в жидкой неселективной среде (буферная, пептонная вода, МПБ) при 37⁰С;
- обогащение – посев предварительно обогащенной среды в две жидкие селективные среды (селенитовый бульон, тетратионатная среда) с

последующим выдерживанием в термостате соответственно при 37 или 42⁰С в течение 24-48 ч, (в этих средах происходит накопление энтеробактерий и подавление сопутствующей микрофлоры);

- пересев с двух обогащенных сред на плотные селективно-диагностические среды в чашках Петри (БФ-агар, среда Эндо), которые после выдерживания в термостате при 37⁰С исследуют на наличие колоний, по своим характеристикам подозрительных на сальмонеллы;

- идентификация – пересев подозрительных на сальмонеллы колоний и определение культурально-биохимических и антигенных свойств выделенных микроорганизмов.

Методика. Для проведения исследования измельчают навеску продукта массой 25 г с соблюдением правил асептики. Затем измельченную навеску гомогенизируют в 225 мл буферной пептонной воды (получается разведение 1:10), помещают в термостат при 37⁰С на 16-20 ч. После этого по 10 мл пептонной воды пересевают в две колбы со 100 мл среды (в первой колбе тетратионатная среда, во второй – селенитовая). Колбы помещают в термостат: первую при 42⁰С, а вторую – при 37⁰С.

Через сутки из проросших колб бактериологической петлей проводят пересев на БФ-агар или висмут-сульфитный агар (чаще используют агар Эндо), чтобы получить изолированные колонии. В дальнейшем из подозрительных колоний готовят мазки, окрашивают по Граму, определяют подвижность в препарате «висячая» или «раздавленная капля».

Далее изучают ферментативную активность, антигенную структуру, устанавливают род и вид сальмонелл.

В заключении указывают, обнаружены или отсутствуют сальмонеллы в 25 г исследуемого продукта.

Индикация сульфитредуцирующих клостридий (СРК) основана на высеве навески и его разведений, либо культуральной жидкости в железосульфитсодержащие среды и подтверждении принадлежности выросших при 37⁰С в течение 72 ч микроорганизмов к СРК по

морфологическим и культурально-биохимическим признакам. Наличие СРК в соответствии с Санитарными правилами и нормами не допускаются в 0,1 г консервированного продукта.

Исследование проводят для анализа микрофлоры посевов (культуральной жидкости), в которых при определении промышленной стерильности обнаружены мезофильные клостридии, и необходимо подтверждение присутствия в посевах *Cl.perfringens*.

Методика. По 1 г подготовленной пробы продукта (или его разведения) вносят параллельно в две чашки Петри и заливают расплавленной и охлажденной до 50⁰С средой Вильсон-Блера (или сульфит-полимиксин-неомициновый агар), равномерно перемешивают с посевным материалом, а после застывания заливают слоем голодного агара. Чашки выдерживают в анаэробных условиях при 37⁰С в течение 24 ч. Посевы просматривают, отбирают те чашки, в которых выросло от 15 до 150 характерных черных колоний, подсчитывают их количество.

Для подтверждения принадлежности обнаруженных колоний к *Cl.perfringens*, отбирают не менее 5-ти с характерными признаками и пересевают их в МППБ для мезофильных анаэробных микроорганизмов. Посевы культивируют в термостате 24 ч при 37⁰С и изучают морфологические и биохимические свойства культуры.

Cl.perfringens – крупные грамположительные палочки, расположенные одиночно или в виде коротких цепочек. Споры овальные, расположенные субтерминально. Каталазу не образуют, ферментируют лактозу, разжижают МПЖ, в лакмусовом молоке образуют губчатый сгусток красновато-сиреневого цвета. Для них характерен анаэробный рост.

Выявление ботулинического токсина в консервах. Методика: продукт измельчают, растирают в стерильной ступке до однородной консистенции, добавляя физраствор до соотношения 1:1. Полученную смесь экстрагируют в холодильнике в течение 2 ч. Затем фильтруют через ватно-марлевый фильтр, полученный фильтрат переносят в две пробирки по 3 мл, в третью - 2,7 мл

фильтрата, в который добавляют 0,3 мл раствора трипсина, устанавливают рН 6,0 и ставят в термостат на 1 ч, периодически перемешивая.

Содержимое первой пробирки оставляют без обработки, а второй – кипятят в водяной бане 10 мин для разрушения ботулинического токсина и охлаждают до комнатной температуры.

Биопробу ставят на белых мышах массой 15-20 г, которым вводят внутрибрюшинно по 0,5 мл исследуемых фильтратов. Наблюдение за животными проводят через 1,2,4,12ч., далее - 2 раза в день в течение 3 суток. Клинические симптомы ботулинической интоксикации появляются через 10-12 ч, токсином типа Е – через 2-4 ч. При этом у мышей шерсть взъерошена, дыхание затруднено, мышцы брюшной стенки ослаблены и западают («осиная талия»), наблюдаются судороги, паралич задних конечностей. Гибель животных наступает через 4-6 ч, а при высоких концентрациях токсина – в течение 1-2 ч без характерных признаков, в этих случаях биопробу повторяют с разведением исходной жидкости 1:10-1:100.

При наличии в материале ботулинических токсинов вначале болеют и погибают те животные, которым введена необработанная исходная жидкость или обработанная протеолитическим ферментом. Мыши после инъекции прокипяченной жидкости остаются здоровыми на протяжении всего опыта.

Для индикации и определения количества золотистого стафилококка делают посев исследуемых консервов с использованием селективно-диагностических сред по схеме: а) высев навески; б) подсчет колоний с характерными для стафилококка признаками; в) идентификацию выделенных культур. Если в посевах обнаружены грамположительные кокки, способные коагулировать плазму крови, образующие каталазу, ферментирующие мальтозу в анаэробных условиях, то выявленные микроорганизмы относят к *Staph. aureus*.

При определении потенциальной **энтеротоксичности** выделенных культур *Staph. aureus* устанавливают их способность образовывать термостабильную нуклеазу по следующей методике:

- готовят суточную культуру изучаемого стафилококка в МПБ и прогревают ее 15 мин в кипящей бане;

- готовят чашки Петри с МПА содержащим ДНК, асептически вырезают «колодцы» диаметром 4 мм, на расстоянии 7-8 мм друг от друга;

- в эти колодцы вносят по 1-2 капли прогретой бульонной культуры *Staph. aureus*;

- чашки ставят в термостат, результаты учитывают через 1, 2 и 5 ч. При наличии **термостабильной нуклеазы** вокруг «колодцев» появляется ярко-розовая зона на синем фоне среды.

Микробиологические показатели консервов в соответствии с Санитарными правилами и нормами представлены в таблице 5.

Таблица 5. Микробиологические нормативы мясных консервов

Группа продуктов	МАФАнМ КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются следующие виды бактерий			
		БГКП	СРК	S.aureus	Патогенные МО, в т.ч. сальмонеллы
Консервы пастеризованные из говядины и свинины	2×10^2	1	0,1	1	25
Консервы стерилизованные из говядины и свинины	Должны удовлетворять требованиям промышленной стерильности для консервов группы А				

Задания для самостоятельной работы студентов

1. Провести вскрытие консервной банки, с соблюдением правил асептики взять содержимое банки для бактериологического исследования.

2. Сделать посев пробы для определения МАФАнМ в 1 г консервов.

3. Сделать посев пробы исследуемых консервов в МППБ и среды Вильсон-Блера для обнаружения анаэробных бактерий.

ТЕМА 5. Бактериологическое исследование колбасных изделий и продуктов из мяса

Материальное оснащение. Образцы вареных и копченых видов колбас. Стерильные чашки Петри, скальпели, ножницы, пинцеты, весы с разновесками, ступки с пестиком, стерильный песок. Чашки Петри с питательными средами – агаром Эндо, Левина, Плоскирева, пробирки со средой Крумвиде-Олькеницкого. Стерильный физраствор в колбах по 90 мл, в пробирках по 9 мл, стерильные пипетки на 1, 10 мл, стерильные мензурки.

Бактериологическое исследование колбасных изделий и продуктов из мяса. Отбор проб проводят в соответствии с ГОСТ 9792-73, ГОСТ Р51447-99, Гост 26668-85

Колбасные изделия – продукты переработки мяса, которые употребляют в пищу без дополнительной подготовки, т.к. мясо, используемое для приготовления, подвергают специальной механической, физико-химической и термической обработке. К этим изделиям относятся фаршированные, вареные, полукопченые, варено-копченые, сырокопченые, ливерные и кровяные колбасы, мясные хлебцы, сосиски, сардельки, студни.

Колбасные изделия представляют собой благоприятную среду для развития различных микроорганизмов, вызывающих микробную порчу: термофильных молочнокислых бактерий (закисание), плесневых грибов и протеолитических бацилл (гниение). Быстро портятся варенокопченые и вареные колбасные изделия влажностью более 40-50%, особенно при нарушениях температурно-влажностного режима хранения. В меньшей степени подвержены порче сырокопченые изделия из-за низкого содержания влаги (20-30%).

Степень исходной микробной обсемененности колбасного фарша зависит от санитарно-гигиенических условий производства и соблюдения технологических режимов. В процессе приготовления колбасных изделий, мясной фарш обсеменяется различными микроорганизмами, попадающими в

него из вспомогательных материалов: молочные, яичные, мучные продукты, белковые стабилизаторы, посолочные смеси (соль, сахар, нитраты), пряности, лук, чеснок и другие компоненты.

Бактериологическое исследование колбасных изделий направлено на определение количества МАФАНМ, БГКП, индикацию сальмонелл, бактерий родов *Proteus*, микроорганизмов порчи – в основном это дрожжи и плесневые грибы.

Отбор, подготовка проб и проведение исследования.

Пробы продуктов для микробиологического исследования отбирают раньше проб для физико-химического и органолептического исследования с соблюдением правил асептики, в стерильную посуду, с применением стерильных инструментов. Масса пробы установлена НТД на конкретный вид продукции, достаточной для проведения полного микробиологического анализа.

От кусковой продукции массой нетто до 1000 г отбирают точечные пробы ложкой, пинцетом или другими инструментами в зависимости от вида и размера кусков и помещают в посуду или упаковывают в фольгу. Пробы скоропортящихся продуктов транспортируют при температуре 5⁰С не более 6 часов.

От кусковой продукции массой нетто более 1000 г пробы отбирают одним из следующих методов:

- отрезают или вырезают часть продукта ножом или пилой. У изделий квадратной формы разрез делают перпендикулярно к грани, продольной формы – перпендикулярно к продольной оси;

- продукт в нескольких местах режут ножом и с поверхности разреза и из глубины продукта скальпелем берут необходимое количество кусков, которые пинцетом переносят в стерильную посуду;

- срезают поверхностный слой продукта толщиной от 0,5 до 1 см ножом, при помощи буравчика или зонда и выдавливают продукт в посуду. При

отборе пробы из глубины продукта его просверливают в разных местах не менее чем до половины высоты;

Каждую отобранную пробу маркируют этикетками с указанием наименования продукта, предприятия-изготовителя, номера партии, даты отбора продукта, цели микробиологического анализа, подписи лиц, отбравших пробу. Пробы, предназначенные для исследования вне предприятия, пломбируют, опечатывают и транспортируют в лабораторию.

В зависимости от вида продукта объединенную пробу массой 50 г составляют из точечных проб следующим методом.

Колбасные изделия в оболочке, продукты из говядины, свинины, баранины помещают в эмалированный поддон, тщательно протирают спиртовым тампоном и дважды обжигают над пламенем спиртовки. Затем батоны разрезают продольно стерильным ножом на две половины, не рассекая оболочку противоположной стороны батона. Пробу отбирают из нескольких участков центральной части батона и из-под оболочки обеих его половинок.

Изделия без оболочки (мясные хлебцы, студни и др.) исследуют с поверхности и в глубине. Для этого после развертывания упаковки с каждого из исследуемых образцов делают смыв новым стерильным увлажненным ватным тампоном с тех участков продукта, с которыми могли соприкоснуться руки упаковщика. Тампоны помещают в пробирки, заполненные на $\frac{3}{4}$ одной из сред: ХБ, Хейфеца или Кесслера. Для анализа глубинных участков образцы изделий без оболочки помещают на стерильный эмалированный поддон, смачивают спиртом и обжигают. Делают продольный разрез и отбирают навеску методом, указанным для колбасных изделий в оболочке. Составляют одну объединенную пробу для каждого образца в отдельности и помещают ее в предварительно взвешенную стерильную чашку Петри.

Из объединенной пробы каждого образца берут в стерильную посуду (или пергаментную бумагу) навеску массой 20 г, которую помещают в стерильный стакан гомогенизатора, добавляют 4-кратное количество стерильного физраствора и гомогенизируют в электрическом смесителе (можно магнитной

мешалке). Вначале материал измельчают на кусочки при замедленной частоте вращения ножей, затем – при 15000-20000 об/мин в течение 2-3 мин.

При отсутствии гомогенизатора допускается приготовление исследуемой взвеси в ступке. 20 г продукта растирают в стерильной фарфоровой ступке с 2-3 г речного песка, постепенно приливая 80 мл стерильного физраствора.

В том и другом случае в 1 мл приготовленной взвеси (разведение 1:5) содержится 0,2 г исследуемого продукта.

Взвесь 15 мин выдерживают при комнатной температуре и делают высев для определения количества МАФАНМ, БГКП, бактерий рода сальмонелла и протей, сульфитредуцирующих клостридий.

Методика определения МАФАНМ. Из каждой пробы колбасных изделий делают не менее двух различных по объему посевов, взятых с таким расчетом, чтобы на чашках выросло от 30 до 300 колоний. В одну чашку Петри вносят 0,1 г, а в другую – 0,01 г продукта.

Предварительно готовят первое 10-ти кратное разведение исследуемой взвеси. Стерильной пипеткой 5 мл приготовленной взвеси переносят в пробирку с 5 мл стерильного физраствора – получилось разведение 1:10. Другой стерильной пипеткой содержимое пробирки тщательно перемешивают продуванием, набирают 1 мл и вносят в стерильную чашку Петри (т.е. провели посев 0,1 г продукта).

Для посева 0,01 г продукта готовят второе разведение - 1:100: для этого стерильной пипеткой тщательно перемешивают содержимое пробирки с первым разведением, набирают 1 мл и переносят в пробирку с 9 мл стерильного физраствора (теперь в 1 мл содержится 0,01 г исследуемого продукта). 1 мл такого разведения вносят в чашку Петри. Обе чашки заливают 15 мл МПА, расплавленного и охлажденного до 50⁰С, перемешивают тщательно, чтобы выросли изолированные колонии. После застывания агара чашки помещают в термостат при 37⁰С, через 48 ч подсчитывают общее количество колоний, выросших на поверхности и в глубине агара, умножают на степень разведения исследуемого продукта по каждой чашке и выводят

среднее арифметическое результатов подсчета двух чашек с разной массой посеянного продукта.

Методика индикации БГКП. Цель индикации бактерий этой группы – проверка соблюдения режима термической обработки колбас или санитарно-гигиенических условий в процессе производства сырокопченых колбасных изделий. Исследование на БГКП проводят по общепринятой методике с использованием сред, содержащих углеводы (лактоза, глюкоза). К ним относятся среды Хейфеца, ХБ, Кода, Кесслера. БГКП ферментируют глюкозу и лактозу, поэтому в перечисленных средах образуются кислые продукты, меняющие цвет индикатора, а в среде Кесслера можно наблюдать появление в поплавках пузырьков газа.

При микробиологическом контроле колбасных изделий в производственных лабораториях можно ограничиться обнаружением БГКП без их биохимической дифференциации. Для выявления БГКП в пробирки с 5 мл среды ХБ или Хейфеца двойной концентрации вносят по 5 мл исследуемой взвеси стерильной пипеткой с широким концом. Допускается применение среды Кесслера по 10 мл. Посевы термостатируют при 37⁰С в течение 18-20 ч. Посевы смывов, отобранных тампонами с поверхности изделий без оболочки, выдерживают при температуре 43⁰С для обнаружения повторного бактериального загрязнения. При росте БГКП среда ХБ окрашивается в желтый цвет, среда Хейфеца – в салатно-зеленый, на среде Кесслера в поплавках образуется газ.

Для окончательного заключения о присутствии в колбасе БГКП проводят высев со среды Кесслера (из забродивших проб) или Хейфеца (если произошло изменение цвета среды) в чашки Петри со средой Эндо (Плоскирева, Левина) и помещают в термостат при 37⁰С на 18-20 ч. На среде Эндо БГКП образуют темно-красные колонии с металлическим блеском, на среде Плоскирева – кирпично-красные, на среде Левина – темно-фиолетовые колонии. Из подозреваемых колоний готовят мазки, окрашивают по Граму – обнаруживают грамотрицательные палочки.

Обнаружение коротких с закругленными концами грамотрицательных палочек, специфически изменяющих цвет жидких дифференциально-диагностических сред и образующих характерные колонии на элективных средах с лактозой, указывает на наличие БГКП.

Среды для индикации бактерий группы кишечных палочек.

Среда Хейфеца – выпускается в сухом виде. В состав, кроме основных питательных компонентов (вода, пептон, маннит, натрия хлорид) входят розоловая кислота, раствор метиленового синего. Готовая среда **красно-фиолетового цвета**, при росте кишечной палочки рН сдвигается в кислую сторону, и среда **приобретает зеленоватую окраску**

«ХБ» (хинозолбромкрезолпурпурная среда). В 1000 мл воды растворяют 10 г пептона, 5 г хлорида натрия, 5 г маннита. Приготовленную смесь кипятят 15-20 мин, устанавливают рН 7,4-7,6, фильтруют через бумажный фильтр, кипятят фильтрат 10 мин, охлаждают до

60⁰С, после чего прибавляют 30 мл дрожжевого диализата, 15 мл желчи, 10 мл раствора хинозола и 10 мл 1,6% спиртового раствора бромкрезола пурпурного. Среду разливают в стерильные пробирки по 7-8 мл.

Среда Кесслера К 1000 мл дистиллированной воды добавляют 10 г пептона и 50 мл бычьей желчи. Смесь кипятят на водяной бане при помешивании 20-30 мин, фильтруют через вату, добавляют 2,5 г лактозы, доводят объем дистиллированной воды до 1000 мл, устанавливают рН 7.4-7.6, добавляют 2 мл 1%-ного водного раствора генциан-виолета, разливают в пробирки с поплавками по 8-10 мл и стерилизуют при температуре 121⁰С в течение 10 мин. Готовая среда имеет темно-фиолетовый цвет.

Индикация сальмонелл. Навеску колбасы массой 25 г от объединенной пробы, тщательно измельченной ножницами, вносят во флакон, содержащий 100 мл среды обогащения (Мюллера, Кауфмана, хлористо-магниевой) или 225 мл селенитового бульона. Флакон встряхивают и ставят в термостат при 37⁰С на 24 ч. Затем петлей или пастеровской пипеткой проводят высев из среды

обогащения в чашки Петри со средой Эндо, Плоскирева, Левина или ВСА. Посевы помещают в термостат при 37⁰С на 16-24 ч.

На среде Эндо, Плоскирева и Левина бактерии из рода сальмонелл образуют бесцветные колонии. На ВСА сальмонеллы образуют черные или коричневые колонии с металлическим блеском, при этом участок среды под агаром чернеет. Не менее 5-ти изолированных колоний, характерных для сальмонелл, пересевают на трехсахарный агар Крумвиде-Олькеницкого в модификации Ковальчука штрихом по скошенной поверхности и уколом в столбик и инкубируют при 37⁰С в течение 12-16 ч.

При росте сальмонелл на трехсахарном агаре цвет скошенной поверхности среды розовый, столбик желто-бурый. Газообразование устанавливают по наличию трещин и разрыву столбика агара, при образовании сероводорода питательная среда чернеет.

Другие грамотрицательные бактерии семейства энтеробактерий дают следующие изменения цвета трехсахарного агара:

- БГКП на трехсахарном агаре вызывают окрашивание среды в синий или сине-зеленый с образованием газа или без него;

- палочка протей вызывает окрашивание среды в ярко-красный цвет (вследствие расщепления мочевины), в случае выделения H₂S может появиться черный осадок с возможным разрывом агара.

Для дальнейшей идентификации бактерий готовят мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют, а также изучают антигенные свойства путем постановки РА на предметном стекле с поливалентной (или комплексной) сальмонеллезной агглютинирующей сывороткой. Далее проводят идентификацию с помощью монорецепторных О- и Н-агглютинирующих сальмонеллезных сывороток.

Обнаружение подвижных (кроме *S.pullorum* и *S.gallinarum*), грамотрицательных палочек, дающих характерный рост на элективных средах, не ферментирующих лактозу и сахарозу, сбрасывающих глюкозу и манит до кислоты и газа (*S. typhi suis* маннит неферментирует), образующих H₂S и не

образующих индол, дающих положительную реакцию агглютинации с комплексными, монорецепторными O- и H-агглютинирующими сальмонеллезными сыворотками, указывает на выделение бактерий из рода сальмонелл.

Индикация протей в H-форме проводится внесением исследуемого продукта в конденсат свежескошенного МПА (метод Щукевича). Посевы помещают в термостат на 18-24 ч при 37⁰С. При наличии в исследуемом продукте протей, подвижная палочка поднимается вверх, по скошенной поверхности агара, образуя вуалеобразный голубоватый налет. Культура издает характерный гнилостный запах.

Обнаружение полиморфных грамтрицательных палочек, подвижных, сбрасывающих глюкозу и мочевины, неферментирующих лактозу и маннит, указывает на наличие в продукте бактерий из рода протей.

Индикация стафилококка в исследуемом продукте основана на изучении морфологии, культуральных свойств и способности некоторых стафилококков ферментировать лецитиназу и коагулировать цитратную плазму крови кролика под воздействием фермента коагулазы.

Вначале исследуемый продукт разводят 1:10, вносят в МПБ, содержащий 6,5% натрия хлорида. После инкубирования в термостате проводят пересев на молочно-солевой агар для изучения наличия пигмента и на желточно-солевой агар для выявления лецитиназной активности.

Посевы выдерживают 24 часа в термостате и сутки при комнатной температуре, затем учитывают результат: на поверхности питательной среды колонии стафилококка имеют вид слегка выпуклых круглых колоний с ровными краями; на желточно-солевом агаре колонии стафилококков могут образовывать «радужный венчик», что является одним из признаков их патогенности (лецитиназная активность).

Не менее чем из 5-ти типичных колоний готовят препараты, которые окрашивают по Граму. При наличии стафилококков обнаруживают

грамположительные кокки, располагающиеся в виде кучек и гроздьев винограда.

Для подтверждения патогенности выделенных стафилококков ставят реакцию плазмокоагуляции по методике: в пробирку с 0,5 мл цитратной плазмы крови кролика, разведенной физраствором (1:5) вносят петлю чистой суточной культуры стафилококка и ставят в термостат при 37⁰С. Реакцию плазмокоагуляции предварительно учитывают через 3-4 часа (осторожно, не встряхивая пробирку). В сомнительных случаях пробирки оставляют в термостате для окончательного учета через 24 ч. Реакцию считают положительной, если плазма коагулирует в сгусток (реакцию оценивают по степени плотности сгустка от одного до четырех плюсов).

Индикация сульфитредуцирующих клостридий (СРК) в колбасе основана на учете специфического роста клостридий в железосульфитсодержащих средах. При взаимодействии натрия сульфита с хлоридом железа образуется сульфат железа, который вызывает почернение питательной среды.

Для выявления СРК 1 мл исследуемой взвеси стерильной пипеткой вносят в пробирку с 9 мл жидкой сульфит-цикосериновой среды или среды Вильсон-Блера. Затем проводят последовательные пересевы на аналогичные объемы среды и получают возрастающие 10-ти кратные разведения суспензии. Посевы выдерживают 18-20 ч при 37⁰С, при наличии СРК среда чернеет.

Для подтверждения принадлежности выделенных культур к клостридиям проводят пересев на поверхность агаризованной плотной среды Вильсон-Блера и инкубируют в анаэробных условиях при 37⁰С в течение 24-48 ч. Отбирают типичные колонии и изучают микроорганизмы по морфологическим и некоторым культурально-биохимическим свойствам, в частности по отрицательной реакции на каталазу.

Если в посевах (в 4 колониях из 5) обнаружены СРК, нередко спорообразующие палочки, грамположительные, каталазоотрицательные, способные расти в анаэробных условиях, то делают заключение о наличии в

продукте СРК по максимальному разведению суспензии, в посеве которого наблюдается почернение среды. Например, если характерные изменения наблюдаются в пробирках с разведением 10^{-1} , то считают, что в 1 г исследуемого продукта содержится 10 клеток, при аналогичных изменениях в пробирках с разведением 10^{-2} - 100 клеток.

При получении неудовлетворительных результатов микробиологического анализа готовой продукции, по требованию контролирующих организаций и постоянно при входном контроле проводят исследование вспомогательных материалов.

Микробиологические показатели колбасных изделий и продуктов из мяса регламентированные Санитарными правилами и нормами представлены в таблице 6.

Таблица 6 . Микробиологические нормативы колбасных изделий и продуктов из мяса животных и птиц

Группа продуктов	МАФАНМ КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускается наличие			
		БГКП	СРК	S.aureus	Патогенных МО в т.ч.Salmonell
Колбаса сырокопченая	-	0,1	0,01	1	25
Вареные колбас. изделия, сардельки, сосиски:					
- высшего и 1 сорта	$1 \cdot 10^3$	1	0,01	1	25
- 2-го сорта	$2,5 \cdot 10^3$	1	0,01	1	25

Задания для самостоятельной работы

1. Провести бактериологическое исследование вареной колбасы для определения количества МАФАНМ.

2. Провести бактериологическое исследование вареной колбасы для определения наличия БГКП.

3. Провести бактериологическое исследование вареной колбасы для индикации сальмонелл.

ТЕМА 6. Бактериологическое исследование и оценка качества яиц и яичных продуктов

Материальное оснащение: куриные яйца, яичный порошок, 0,5%-ный раствор кальцинированной соды, 70%-ный спирт, стерильный физраствор в колбах по 200-300 мл, в пробирках по 9 мл, стерильные пипетки, стерильные марлевые тампоны 5x5 см в чашках Петри, стерильные ступки, чашки Петри, МПА столбиком в пробирках по 12 мл, Среды Кесслера, Кауфмана, среды обогащения, Крумвиде-Олькеницкого, Клиглера, стерильные мензурки.

При бактериологическом исследовании яиц руководствуются СТСЭО ГОСТ30364.2.96. Микробиологические показатели яиц и яичных продуктов оценивают в соответствии с СанПин 2.3.2.560-96

Санитарно-микробиологическому контролю подвергают поступающее сырье (яйца куриные), готовые продукты: яичный меланж, яичный порошок, а также контроль соблюдения технологических и санитарно-гигиенических режимов производства яйцепродуктов.

Яйца для микробиологического анализа, отбирают из разных мест партии методом случайной выборки в количестве 30 штук (в некоторых случаях – не менее 5-10 яиц). Отобранную пробу упаковывают в чистую тару и транспортируют в условиях, исключающих их повреждение и вторичную контаминацию (загрязнение).

Особенностью санитарно-микробиологического исследования яиц и продуктов их переработки заключается в одновременном исследовании микрофлоры на поверхности скорлупы и содержимом яйца.

При микробиологическом исследовании **поверхности скорлупы яиц** делают смывы, полученные а) методом тампона или б) методом ополаскивания или в) методом измельчения.

- При получении смыва **методом** тампона в ступку, содержащую 10 мл стерильного физраствора, погружают яйцо и с помощью стерильного тампона обмывают поверхность яйца в течение 2-3 мин, полученный смыв исследуют.

- При получении смыва **методом ополаскивания** в стерильную посуду или полиэтиленовый пакет наливают 10 мл стерильной жидкости, в которую погружают яйцо и встряхивают 5 минут. Полученный смыв исследуют.

-При получении смыва **методом измельчения - скорлупу и подскорлупную оболочку** от трех яиц отделяют от содержимого и помещают в стерильные ступки. Содержимое растирают пестиком, заливают 90 мл стерильной жидкости. После 3-5 мин отстаивания надсадочную жидкость исследуют без разведения или готовят десятикратные разведения в зависимости от степени загрязнения поверхности скорлупы.

Математически поверхность яйца вычисляют по формуле:

$$S = \frac{V \cdot P}{2}$$

Где: S - площадь поверхности

V - ширина яйца, см

P - длина окружности, см

π - 3,14

Общую бактериальную **обсемененность поверхности яиц** (т.е. количество МАФАНМ), определяют общепринятыми методами путем посева 1 мл смыва или его 10-ти кратных разведений параллельно в две чашки Петри, которые заливают 15 мл расплавленного и охлажденного до 50⁰С МПА, культивируют при 30⁰С. в термостате 48-72 ч. Подсчитывают все колонии, выросшие в глубине и на поверхности плотной питательной среды, определяют среднее арифметическое число колоний по двум чашкам одного разведения, умножают на величину разведения и делят на площадь поверхности скорлупы яиц. В результате получают количество микроорганизмов (КОЕ/см²) на 1 см² скорлупы яиц.

Перед микробиологическим исследованием **содержимого яиц** поверхность скорлупы обмывают теплым 0,2%-ным раствором каустической соды или 0,5%-ным раствором кальцинированной соды в течение 2 минут.

После мойки яйцо ополаскивают водопроводной водой, дают стечь и погружают в 70% спирт на 10 мин, после чего обжигают в пламени.

На остром конце яйца делают отверстие диаметром около 1 см и снова обжигают, содержимое одного или нескольких яиц выливают в колбу и гомогенизируют с помощью бус или пипеток до однородной консистенции. Исследование проводят сразу, для этого 10 мл яичной массы переносят в колбу, содержащую 90 мл стерильного физраствора – это исходное разведение 1:10, из которого переносят 1 мл в пробирку с 9 мл физраствора, получая разведение 1:10, 1:100 и т.д. до нужного конечного разведения.

Микробиологическое исследование содержимого яиц сводится к определению МАФАНМ, выявлению БГКП, золотистого стафилококка, протей, сальмонелл, в некоторых случаях *V.cereus*.

Для определения МАФАНМ (КОЕ/г или КОЕ/мл) по 1 мл полученных разведений вносят параллельно в чашки Петри (по 2 чашки на каждое разведение) и заливают расплавленным и охлажденным до 45⁰С МПА. Тщательно перемешивают, после застывания инкубируют при 30⁰С в течение 72 ч. Подсчитывают все выросшие колонии, по результатам подсчета определяют среднее арифметическое значение числа колоний из всех посевов одного разведения.

Количество КОЕ в 1 г яичных продуктов определяют по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 10^n}{V},$$

Где: а – среднее арифметическое число колоний в чашке; n – степень десятикратного разведения продукта; V – объем посевного материала, внесенного в чашку. Результаты исследований записывают следующим образом: количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов 1,0 x 10 КОЕ/г.

Для выявления БГКП проводят посев по 1 мл натурального продукта, и из разведений 1:10, 1:100 в среду Кесслера, посевы культивируют 24 ч в

термостате при 37⁰С. Из пробирок с признаками роста делают посев на среду Эндо и выдерживают 24 ч при 37⁰С. Затем посеvy просматривают и отмечают рост колоний характерных для БГКП, не менее чем из трех характерных колоний готовят препараты, окрашивают по Граму и микроскопируют. Результаты оценивают по каждой пробе отдельно. Обнаружение на среде Эндо колоний с характерными признаками роста, наличие в мазках грамтрицательных палочек, сбраживающих лактозу, указывает на присутствие в продукте БГКП.

Результат записывают следующим образом: не обнаружены (или обнаружены) БГКП в 0,1 мл жидких (в 0,1 г сухих) яичных продуктов.

Для индикации сальмонелл - 25 мл натурального продукта вносят в колбу, содержащую 225 мл среды обогащения (Кауфмана, магниевой или селенитовой), встряхивают, термостатируют при 37⁰С в течение 20 ч. Затем из среды обогащения бактериологической петлей проводят высев в чашки Петри с ВСА (средой Плоскирева, Левина), выдерживают в термостате. Учет результатов проводят на ВСА через 48 часов, а на средах Плоскирева, Левина – через 24 ч. Из типичных для сальмонелл колоний берут не меньше трех и пересевают в пробирки с МПА, МПБ, и на дифференциальную среду Крумвиде–Олькеницкого или Клиглера). Среды Крумвиде-Олькеницкого или Клиглера засевают штрихом на скошенную поверхность, а затем уколом в глубину столбика. Посевы инкубируют в термостате при 37⁰С в течение 24 ч.

Выросшие колонии с поверхности дифференциальных сред используют для постановки РА и приготовления мазков. У полученных культур изучают морфологические, тинкториальные, ферментативные свойства, способность образовывать сероводород и другие свойства, характерные для бактерий рода *Salmonella*.

Микробиологические показатели яиц и яичных продуктов регламентированные Санитарными правилами и нормами представлены в таблице 7.

Таблица 7. Нормативы микробиологических показателей яиц и яичных продуктов

Продукт	МАФАНМ КОЕ/г, не более	Масса продукта в г., в которой не допускается наличие следующих бактерий			
		БГКП	S.aureus	Протей	Salmonell
Яйцо куриное, перепелиное, диетическое	$5 \cdot 10^3$	0,1	-	-	25
Яйцо куриное, столовое	$5 \cdot 10^5$	0,01	-	-	25
Меланж яичный, мороженный	$5 \cdot 10^5$	0,1	1	1	25

Бактериологическое исследование яичных продуктов

При микробиологическом исследовании **яичных мороженных продуктов** (меланжа, белка, желтка) для проверки соответствия качества яичных мороженных продуктов требованиям действующей нормативно-технической документации из разных мест партии отбирают 3% ящиков, но не менее шести. Из общего количества отобранных ящиков отбирают по одному пакету, банке, из каждого отобранного в выборку ящика. Из разных мест каждого пакета, банки стерильным масляным щупом отбирают не менее четырех столбиков продукта в стерильную посуду. Перед проведением микробиологического исследования пробы размораживают в водяной бане при температуре не выше 45°C до температуры внутри продукта не выше $1-5^{\circ}\text{C}$.

Отобранные пробы соединяют, тщательно перемешивают и получают объединенную пробу массой не более 0,5 кг, которую помещают в стерильную посуду с притертой пробкой. Из объединенной пробы отбирают 100 г продукта для проведения микробиологического анализа, остальную часть используют для проведения органолептических и физико-химических методов анализа.

Для оценки санитарно-микробиологического качества **яичных сухих продуктов** из разных мест исследуемой партии отбирают 3% единиц упаковки, но не менее 3-х единиц. Из разных мест отобранной в выборку

упаковочной единицы отбирают не менее трех точечных проб, взятых в равном количестве.

Отбор проб осуществляют щупом, черпаком, ложкой, металлической трубкой, шпателем или другим приспособлением, которые каждый раз перед использованием стерилизуют фламбированием или заранее в автоклаве.

Масса пробы, отобранной из каждой бочки, мешка, ящика или банки должна быть 200 г. От партии сухого яичного продукта, фасованного в пакеты, отбирают из разных мест каждого отобранного в выборку ящика по три пакета. Пробы соединяют, тщательно перемешивают, подвергают квартованию и получают объединенную пробу массой 0,5 кг.

Объединенную пробу яичного порошка делят на две равные части, которые помещают в чистые стерильные стеклянные банки с притертыми пробками или полиэтиленовые пакеты.

Одну часть пробы направляют в лабораторию для исследования, другую пломбируют, снабжают этикеткой и хранят один месяц при температуре не выше 20⁰С и относительной влажности 65-75% на случай разногласий при определении качества сухого яичного продукта. На этикетке указывают: наименование предприятия изготовителя; наименование продукта; дату выработки; номер и размер партии; дату и место отбора проб; фамилию лиц, отобравших пробу; обозначение действующего нормативно-технического документа.

Из объединенной пробы в стерильную посуду отбирают 100 г сухого яичного продукта для проведения анализа, остальную часть пробы используют для проведения органолептических и физико-химических анализов.

Для приготовления разведений навеску сухих яичных продуктов массой 10 г, вносят в колбочку с 90 мл стерильного физраствора, соблюдая правила асептики, и готовят серию десятикратных разведений яичных продуктов в зависимости от предполагаемого обсеменения продукта.

При несоответствии качества яиц и яйцепродуктов по микробиологическим показателям их направляют на выработку термически обрабатываемых продуктов.

Задания для самостоятельной работы

1. Провести бактериологическое исследование скорлупы исследуемых яиц.
2. Провести бактериологическое исследование содержимого яиц для определения количества МАФАНМ методом горячей заливки.
3. Провести индикацию БГКП в содержимом яиц.
4. Провести индикацию сальмонелл в содержимом яиц.

Список литературы

1. Артемьева С.А. и др. Микробиологический контроль мяса животных, птиц, яиц и продуктов их переработки. Справочник. Москва «КолосС». 2002.
2. Ветеринарно-санитарная экспертиза, стандартизация и сертификация продуктов. Под редакцией проф. К.Е.Елемасова, Н.Ф.Шуклина. Издательский дом «Credo» Алма-ата-2002.
3. Госманов Р.Г., Колычев Н.М., Барсков А.А. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. Омск, ОмГАУ, 2008.
4. Госманов Р.Г., Ибрагимова А.И. Ветеринарная санитарная микробиология. Казань, 2006.
5. Дунченко Н.И., Бердутина А.В., Купцова С.В. «Безопасность сырья и пищевых продуктов». Учебное пособие. Москва. 2005
6. Калина Г.П. Энтерококки. – В сб.: Методы санитарно-бактериологических исследований внешней среды. М.: Медицина, 1966, с.53.
7. Кочемасова З.Н. и др. Санитарная микробиология и вирусология. М. Медицина, 1987.
8. Колычев Н.М., Госманов Р.Г. Ветеринарная микробиология и иммунология. М. КолосС, 2006.

9.Крупина А.П. Дифференциация стрептококков, встречающихся в пищевых продуктах. Лаб. дело 1963, №1, с.47-48.

10.Санитарная микробиология. Под редакцией проф. С.Я.Любашенко. М. Пищевая промышленность, 1980.

Список сокращений

АДФ - аденозиндифосфорная кислота

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

БГКП – бактерии группы кишечной палочки

ВИЭВ – Всероссийский институт экспериментальной ветеринарии

ВНИИМП – Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности

ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения

ВСЭ –Ветеринарно-санитарная экспертиза

ГПС – глюкозопептонная среда

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЕД - единица действия

КМА – количество мезофильных аэробов

МАФАНМ – мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы

мкм - микрометр

МПА – мясо-пептонный агар

МПБ – мясо-пептонный бульон

МПЖ – мясо-пептонный желатин

МППБ - мясо-пептонный печеночный бульон

МППГА - мясо-пептонный печеночно-глюкозный глицериновый бульон

нм – нанометр

НТД- научно-техническая документация

ОМЧ – общее микробное число

ПДК - предельно допустимые концентрации
ПГГА – печеночно-глюкозный глицериновый агар
ПГГБ – печеночно-глюкозный глицериновый бульон
РА – реакция агглютинации
РНК – рибонуклеиновая кислота
РП – реакция преципитации
РСК - реакция связывания комплемента
СПМ – санитарно-показательные микроорганизмы
СПФ – свободное от патогенных микробов животное
ЦНС – центральная нервная система
Вас. – Bacillus
Васт. – Bacterium
BCG – Bacterium Calmett-Guerin
Cl. – Clostridium
Ig – Immunoglobulin

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Лабораторные занятия	
Тема 1. Общие правила отбора, консервирования и пересылки проб и продуктов животного происхождения для микробиологических исследований.....	5
Тема 2. Бактериологическое исследование мяса сельскохозяйственных и промысловых животных.....	9
Тема 3. Бактериологическое исследование мяса птиц.....	19
Тема 4. Бактериологическое исследование мясных консервов и сырья для изготовления колбас, фарша, и других видов мясной продукции.....	27
Тема 5. Бактериологическое исследование колбасных изделий и продуктов из мяса.....	39
Тема 6. Бактериологическое исследование и оценка качества яиц и яичных продуктов.....	49
Список литературы.....	55
Список сокращений.....	56
Оглавление.....	58

Подписано к печати

Формат 60x84/16

Заказ 191 Тираж 300

Усл. печ.л.

Бумага офсетная

Печать RISO

Центр информационных технологий КГАВМ

420029, Казань, Сибирский тракт, 35