

Санитарно-микробиологическое исследование мясопродуктов

Санитарно-микробиологическое исследование мясных консервов

Цель занятия. Овладеть методами бактериологического исследования мясных консервов с целью определения их качества, индикации возбудителей пищевых токсикозов и токсикоинфекций, а также возбудителей порчи.

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.

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 используют 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 высева 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 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:

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

$$V_{\text{пр}} \cdot q$$

где n – 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, тетраэтионатная 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 тетраэтионатная среда, во второй – селенитовая). Колбы помещают в термостат: первую при 42⁰С, а вторую – при 37⁰С.

Через сутки бактериологической петлей проводят пересев на БФ-агар и висмут-сульфитный агар (чаще используют агар Эндо), чтобы получить изолированные колонии. 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 (или 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 кластридии, 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 45⁰С 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 7.

Таблица 7

Микробиологические нормативы мясных консервов

Группа продуктов	МАФАНМ КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются			
		БГКП	СРК	<i>S. aureus</i>	Патоген-е 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.

Санитарно-микробиологическое исследование колбасных изделий

Цель занятия. Овладеть методами бактериологического исследования колбас и колбасных изделий с целью определения их качества и индикации возбудителей пищевых токсикозов и токсикоинфекций, а также возбудителей порчи.

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.

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 варено-копченые 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, бактерии 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 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 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 кластридий.

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 исследуемой взвеси переносят в пробирку с 5 мл стерильного физраствора. 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 45⁰С, 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 высеивание 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 определения 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 1 л 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 60С, 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 высеивание 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, пересеивают 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.pulorum* и *S.gallinarum*), грамотрицательных палочек, дающих характерный рост на элективных средах, не ферментирующих лактозу и сахарозу, сбраживающих 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 О- и Н-агглютинирующими сальмонеллезными сыворотками, указывает на выделение бактерий из рода сальмонелл.

Индикация протей в Н-форме проводится внесением исследуемого продукта в конденсат свежескошенного МПА (метод Шукевича). 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 грамотрицательных 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 пробирку 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, грамположительные, нередко спорообразующие палочки, каталазоотрицательные, способные расти в анаэробных условиях, то делают заключение о наличии в продукте СРК по максимальному разведению суспензии, в посевах 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 8.

Таблица 8

Микробиологические нормативы колбасных изделий и продуктов из мяса животных и птиц

Группа продуктов	МАФАНМ КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не не допускается наличие			
		БГКП	СРК	S.aureus	Патогенных микроор-в,в т.ч.Salmonell
1	2	3	4	5	6
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.