

НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

БИОЛОГО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Микробиологическое исследование мяса

**Методические указания
для лабораторно-практических занятий**



Новосибирск 2021

УДК 579:637.5(07)
ББК 28.4:36.92,я7
М 579

Кафедра Экологии

Составители: канд. биол. наук, проф. *Л.А. Литвина*,
ст. преп. *И.Ю. Анфилофьева*

Рецензент канд. биол. наук, доцент *Г.В. Вдовина*

Микробиологическое исследование мяса: методические указания для лабораторно-практических занятий / Новосиб. гос. аграр. ун-т., Биол.-технолог. фак.; сост.: Л.А. Литвина, И.Ю. Анфилофьева. – 3-е изд., доп. и испр. – Новосибирск: Изд-во НГАУ, 2021. – 30 с.

Методические указания для лабораторно-практических занятий «Микробиологическое исследования мяса» предназначены для студентов очной и заочной форм обучения по направлениям подготовки 06.03.01 Биология, 19.03.03 Продукты питания животного происхождения, 19.03.04 Технология продукции и организация общественного питания, 35.03.07 Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции, 36.03.02 Зоотехния.

Данное пособие может быть использовано на лабораторно-практических занятиях по дисциплинам микробиологического направления.

Утверждено и рекомендовано к изданию учебно-методическим советом биолого-технологического факультета (протокол №5 от 18 мая 2021 г.).

© Новосибирский государственный
аграрный университет, 2021

ВВЕДЕНИЕ

Мясо играет большую роль в питании населения. Белки мяса обладают высокой биологической ценностью, так как имеют хорошо сбалансированный аминокислотный состав, наиболее близкий к составу аминокислот белков человека. Белки мяса служат для построения тканей человека, ферментов, гормонов. Мясо и мясные продукты, по данным отдельных исследователей, стимулируют рост, развитие, половое созревание, рождаемость потомства и способствуют его выживаемости. Пищевая ценность разных видов мяса обусловлена в значительной степени соотношением входящих в его состав тканей (мышечной; соединительных – рыхлой и плотной; жировой; костной). Состав тканей различается также в зависимости от вида мяса.

Мясо богато содержанием белков, жиров, углеводов, минеральных веществ и витаминов. Дневная потребность взрослого человека в животном белке (50 г) обеспечивается: 100 г свинины жирной – на 23%, мясной – на 29, беконной – на 33, говядины или баранины I категории – на 33-38, а II категории – на 40%. В состав мяса входят такие незаменимые аминокислоты, как валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, лизин, метионин, треонин, триптофан. При этом соотношение триптофана, метионина и лизина соответствует формуле сбалансированного питания. В свинине меньше, чем в говядине и баранине, неполноценных, трудноусвояемых белков (коллагена, эластина, ретикулина), так как мясо свиней содержит меньше соединительнотканых образований.

В мышечной ткани мяса содержится в среднем 1,1% минеральных веществ. В мясе относительно низкое содержание таких макроэлементов, как кальций и магний, и относительно высокое содержание фосфора. Соотношение кальция и фосфора 1:18, что далеко от оптимального (1:1,5). Содержание калия в мясе в среднем 250-350 мг%. Несмотря на относительно высокое содержание калия в мясе, оно не является основным источником этого важного макроэлемента, так как, например, в картофеле, бобовых, содержание калия значительно выше.

Мясо и мясопродукты выступают основным источником железа для человека. Гемовое железо мясных продуктов хорошо усваивается, что обуславливает целесообразность использования мяса и мясных продуктов при анемии. Мясо является основным источником микроэлемента цинка, недостаточность которого задерживает у детей рост и половое развитие.

Содержание полиненасыщенных жирных кислот с высокой биологической активностью (линолевой и арахидоновой) в говяжьем и бараньем жире относительно невелико – 3-5% от всех жирных кислот, в свином – 4-13, кроличьем и конском – 18-25%. В говяжьем жире содержится витамин А и β-каротин, в свином жире витамина А в 10 раз меньше, а каротина, обладающего свойствами антиоксиданта, свиной и бараний жир практически не содержат. Этим объясняется меньшая устойчивость в хранении замороженной баранины по сравнению с говядиной. Во всех животных жирах по сравнению с растительными жирами низкое содержание витамина Е. Витамин Е – антиокислитель, поэтому растительные жиры более устойчивы к окислительной порче, чем животные.

Температура плавления жира мяса зависит от жирнокислотного состава и составляет для наружного бараньего жира – 44-55 °С, говяжьего – 40-52, свиного – 33-46, кроличьего и конского – в среднем 22 °С. Наличие холестерина отмечается в субпродуктах (мозги – 2%, печень и почки – 0,3%). Мясо можно отнести к источникам фосфолипидов. Высокое содержание фосфолипидов обнаружено в отдельных видах птицы, мясе кроликов, субпродуктах, особенно птичьих.

Основные витамины, источником которых выступает мясо, находятся в мышечной ткани. Это витамины группы В. Тиамин (витамин В₁) содержится в различных видах мяса в количестве 0,1-0,2 мг%. Нежирная свинина по содержанию этого витамина занимает одно из первых мест среди всех пищевых продуктов (0,6-0,8 мг%). Вместе с тем мясо и мясопродукты не являются основным источником тиамина для человека. При тепловой обработке мяса теряется 25-30% этого витамина. Особенно велики потери при производстве консервов.

Содержание рибофлавина (витамин В₂) в мясе в среднем 0,2 мг%. Мясо и мясопродукты как источники этого витамина для человека занимают третье ме-

сто после молочных и зерномучных продуктов. Мясные субпродукты – печень и почки – по содержанию рибофлавина занимают первое место среди пищевых продуктов.

Пиридоксин (витамин В₆) содержится в мясе в значительном количестве и оно, наряду с зерномучными продуктами, рыбой является источником этого витамина для человека. Мясные продукты (вместе с рыбными) – основной источник для человека витамина В₁₂ (цианокобаламин). В растительных продуктах он не содержится, а в молоке его мало. Очень высоко содержание этого витамина в печени, почках.

Мясо является хорошим источником для организма пантотеновой кислоты, биотина, холина.

Относительно много в мясе и ниацина (витамин РР) – 4,8 мг%. Этот витамин в организме человека может синтезироваться из триптофана – незаменимой аминокислоты, которая в достаточном количестве содержится в мясе. Мясо и другие продукты животного происхождения наряду с зерномучными продуктами являются источником витамина РР для человека.

По содержанию витаминов говядина и баранина мало отличаются, в свинине в 6-8 раз больше витамина В₁, меньше витамина В₁₂. В мясе кроликов высокое содержание витамина В₁₂ (в 1,5 раза выше, чем в говядине). Содержание железа выше в верблюжатине, мясе кроликов, телятине, говядине. Баранина содержит в среднем в 1,5 раза меньше пуриновых веществ по сравнению с говядиной и свининой и может быть использована в лечебном питании.

Калорийность мяса (количество килокалорий в 100 г продукта) считается следующей: баранина – 207, говядина – 158, окорок – 360, ветчина – 370, курица – 185, салями – 560 ккал.

1. ОСНОВНЫЕ ИСТОЧНИКИ ОБСЕМЕНЕНИЯ МЯСА

Мясо является ценным продуктом питания, поэтому очень важно, чтобы само мясо и приготовленные из него полуфабрикаты не содержали микроорганизмов, которые могли бы привести к пищевым отравлениям или к порче мяса. Мясо является исключительно благоприятной средой, на которой микроорганизмы развиваются очень быстро. В крови, мышцах здоровых животных, как правило, микроорганизмы отсутствуют, они могут обнаруживаться лишь у больных и ослабленных животных, организм которых не в силах препятствовать проникновению микрофлоры через стенки кишечника. Кроме того, животные утомленные, голодавшие, после переохлаждения также могут содержать в мышцах микроорганизмы, поскольку они проникают через стенки желудочно-кишечного тракта и разносятся кровью. Такой метод поступления микроорганизмов в мышцы (в дальнейшем в мясо) называется **эндогенным** и осуществляется при жизни животного.

Таким образом, при эндогенном обсеменении в мясе могут оказаться как сапрофитные микроорганизмы, не вызывавшие заболевания животных, так и патогенные, если животное было больно. Эти микроорганизмы в дальнейшем приводят либо к порче мяса, либо могут стать источником заболевания для человека. Все это обуславливает необходимость предоставить животному перед забоем, отдых не менее трех суток. В этот период ткани освобождаются от микроорганизмов, в мышцах увеличивается содержание гликогена, а после убоя в таком мясе из гликогена образуется молочная кислота, которая будет препятствовать развитию микроорганизмов. Гликоген, таким образом, является одним из факторов, способствующих сохранению мяса. Наибольшее количество гликогена бывает в мясе у молодняка и упитанных животных, и оно меньше подвергается порче.

Экзогенное обсеменение мяса возникает при попадании микроорганизмов в мясо из внешней среды, при снятии шкуры и последующей разделке туши. На шкуре животного могут встречаться самые различные микроорганизмы. Это не-

патогенные сапрофиты – кокки, бактерии, бациллы. У больных животных на коже могут встречаться грибы, возбудители микозов (дерматомикозов). Источником попадания микроорганизмов на тушу могут быть грязная одежда рабочих, их руки, оборудование. Микроорганизмы снаружи при перерезке шейных кровеносных сосудов животного могут разнестись током крови по всей туше, вызвав обсеменение мышц (мяса). При разделке туши особенно осторожно нужно обращаться с кишечником, не допуская его разрезывания и порывов, так как микроорганизмы кишечника, попав в тушу, вызовут быструю её порчу.

Таким образом, необходимо соблюдать определенные правила и чистоту при забое животных и разделке туши, чтобы все предметы, с которыми соприкасается туша, были чистыми. При необходимости проводят туалет туши – сухую или влажную обработку. При сухой обработке туши не используют воду. Поверхность туши целесообразно подсушить в холодном помещении при температуре 0-4 °С. При этом образуется корочка подсыхания. При влажном туалете используют воду и удаляют большую часть микроорганизмов, но влажность мяса препятствует в дальнейшем образованию корочки подсыхания и уменьшает сохранность мяса. Туша не должна иметь внутреннего и наружного загрязнений, сгустков крови, остатков волоса и внутренних органов. После туалета туши и полутуши подвергают товарной оценке, ветеринарно-санитарной экспертизе и клеймению.

Ветеринарно-санитарной экспертизой инфекционные болезни животных подразделяются на две группы:

1. Передающиеся человеку через продукты убоя.
2. Не передающиеся человеку.

К первой группе, передающихся человеку от животных относятся возбудители следующих инфекций: сибирская язва, туберкулез, бруцеллез, рожа свиней, листериоз, лептоспироз, Ку-лихорадка (Qu-лихорадка), туляремия, ящур и др.

Ко второй группе относятся болезни животных, возбудители которых не передаются человеку через мясо – столбняк, злокачественный отек, псевдотуберкулез, актиномикоз, ботриомикоз.

Существует и третья группа возбудителей инфекций, которые не встречаются у человека, ими болеют только животные – чума свиней, пастереллез, злокачественная катаральная горячка, инфекционный ринит свиней и др.

К заболеваниям профессионального характера, которыми могут заболеть работники, связанные с животноводством, забоем животных и переработкой мяса, относятся возбудители – сальмонеллеза, сибирской язвы, бруцеллеза, туберкулеза, орнитоза, эризипелоида, туляремии, токсоплазмоза и др. Поэтому необходимо соблюдать правила личной гигиены для того, чтобы возбудитель инфекции не попал в организм человека, и в свою очередь, человек не стал бы источником заражения мяса. Для этого проводят медицинское обследование персонала, вакцинацию человека от бруцеллеза, проверку реакции Пирке и Манту на туберкулез, исследования на сальмонеллезное бактерионосительство. На мясоперерабатывающих предприятиях предусматривается наличие дезинфицирующих растворов для обработки рук; спецодежду кипятят с предварительным замачиванием в растворе соды; обувь, резиновые перчатки, фартуки тщательно моют раствором хлорной извести.

В пищу человека должно поступать мясо после убоя здоровых животных. В связи с этим на предприятиях мясной промышленности производят с профилактической целью микробиологическое исследование мяса. Кроме того, мясо подвергается бактериологическому исследованию во всех случаях вынужденного убоя животных и в случаях сомнительного по своим органолептическим свойствам мяса.

В лабораторию на исследование направляют мясо лопаточной и бедренной частей, лимфатические узлы и сопровождают его документом, где указывают вид животного, дату убоя и предполагаемый характер исследования. Порядок отбора образцов для определения свежести мяса и органолептических его качеств приведен в ГОСТ 7269-2015. Методы бактериологического анализа, Методы бактериологического анализа которому подвергается мясо, должны соответствовать ГОСТ 21237-75. Этот ГОСТ предусматривает выявление в мясе и в субпродуктах от всех видов убойного скота следующих микроорганизмов:

аэробных бактерий (бацилл сибирской язвы, бактерий рода сальмонелл, бактерий рода кишечной палочки – эшерихий, бактерий рода протей, бактерий рожи свиней, бактерий листериоза, бактерий пастереллеза, а также бактерий группы кокков); анаэробных бактерий (патогенных и токсигенных клостридий). Обнаружение сальмонелл (арбитражный метод) в мясе и мясных продуктах осуществляется по ГОСТ Р 50455-92 (ИСО 3565-75).

В настоящее время разработан технический регламент ТР ТС 034/2013 ТР ТС «О безопасности мяса и мясной продукции».

1. Настоящий ТР устанавливает основной перечень обязательных требований безопасности мяса и мясной продукции в продовольственной цепи их производства и оборота от переработки убойных животных и до реализации продукции потребителю; правила оценки соответствия мяса и мясной продукции и предупреждения действий, вводящих в заблуждение потребителей мяса и мясной продукции; требования законодательства РФ.

2. Безопасность мяса и мясной продукции обеспечивается соблюдением комплекса ветеринарно-санитарных, санитарно-эпидемиологических требований, и положений производственного контроля, режимов технологических процессов производства, мониторинга и контроля в критических точках на всех этапах, включая производство, а также хранение, перевозку, реализацию, утилизацию или уничтожение продукции организациями-изготовителями, организациями торговли, розничными рынками, индивидуальными предпринимателями и другими организациями, осуществляющими деятельность в сфере производства и оборота продукции, независимо от организационно-правовой формы.

3. Объектами технического регулирования являются следующие виды продукции: мясо и мясная продукция, а также процессы их производства и оборота. Мясо и мясная продукция промышленного производства должны вырабатываться по нормативной и/или технической документации, разработанной, согласованной и утвержденной в установленном порядке.

2. МЕТОДЫ ОТБОРА ОБРАЗЦОВ И ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВЕЖЕСТИ МЯСА (ГОСТ 7269-2015)

2.1 Отбор образцов

Образцы отбирают от каждой исследуемой туши или её части целым куском массой не менее 200 г из следующих мест:

- у зареза, против 4-го и 5-го шейных позвонков;
- в области лопатки;
- в области бедра из толстых частей мышц.

Образцы исследуемых субпродуктов отбирают массой не менее 200 г.

Образцы от замороженных блоков мяса и субпродуктов отбирают целым куском массой не менее 200 г.

Каждый отобранный образец упаковывают в пергамент по ГОСТ 1341-2018, целлюлозную пленку по ГОСТ 7730-89 или пищевую полиэтиленовую пленку по ГОСТ 10354-82.

На ярлыке, вложенном под упаковку, простым карандашом обозначают наименование ткани или органа, номер туши, причины, цели испытания, дату и место отбора.

2.2 Органолептическая оценка мяса

Органолептический метод (органолептика) – метод определения показателей качества продукции на основе анализа восприятий органов чувств – зрения, обоняния, слуха, осязания, вкуса.

Исследование мяса начинают с осмотра образца, учитывая вид, цвет, консистенцию мяса, состояние жира и сухожилий. По свежести мясо принято делить на три категории: свежее, сомнительное и испорченное (негодное в пищу). Изменений органолептических свойств (таблица 1), указывающих на то, что мясо несвежее, достаточно для признания мяса непригодным для употребления без соответствующей переработки.

Таблица 1 – Исследование органолептических свойств мяса

Свойства	Признаки свежего мяса	Признаки мяса сомнительного качества	Признаки несвежего мяса
Внешний вид	Мясо с поверхности туши имеет сухую корочку подсыхания	Мясо с поверхности туши не покрыто корочкой и прилипает к пальцам. Иногда мясо с поверхности слегка покрыто плесенью	Поверхность мяса или сильно подсыхла, или влажная, липкая, или густо покрыта плесенью
Цвет	Бледно-розовый или бледно-красный.	Темный	Серый или зеленоватый
Мышцы на разрезе	Слегка влажные, не оставляют влажного пятна на бумаге; цвет свойственный данному виду мяса: - для говядины – от светло-красного до темно красного; - для свинины – от светло-розового до красного; - для баранины – от красного до красно-вишневого; - для ягнятины – розовый	Влажные, оставляют влажное пятно на фильтровальной бумаге, слегка липкие, темно-красного цвета. Для размороженного мяса – с поверхности разреза стекает мясной сок, слегка мутноватый	Влажные, оставляют влажное пятно на фильтровальной бумаге, липкие, красно-коричневого цвета. Для размороженного мяса – с поверхности разреза стекает мутный мясной сок
Консистенция	Плотное, эластичное. При надавливании пальцами ямка быстро выравнивается	Мягкое, рыхлое. При надавливании пальцами ямка выравнивается не сразу	Дряблое, при надавливании пальцами ямка не выравнивается
Запах	Приятный, характерный для свежего мяса	Затхлый	Гнилостный
Состояние жира	Белый, желтоватый, консистенция твердая, при раздавливании крошится	С сероватым оттенком, при раздавливании мажется	Серый, грязный, иногда покрыт плесенью. Поверхность слизистая. Запах прогорклый
Состояние сухожилий	Сухожилия упругие, плотные, поверхность суставов гладкая, блестящая. У размороженного мяса сухожилия мягкие, рыхлые, окрашенные в ярко-красный цвет	Сухожилия менее плотные, матово-белого цвета. Суставные поверхности слегка покрыты слизью	Сухожилия размяччены, сероватого цвета. Суставные поверхности покрыты слизью
Прозрачность и аромат бульона	Прозрачный, ароматный	Прозрачный или мутноватый, с запахом, несвойственным свежему бульону	Мутный, с большим количеством хлопьев, с резким неприятным запахом

Внешний вид и цвет туши определяют внешним осмотром. Вид и цвет мышц на разрезе определяют в глубинных слоях мышечной ткани на свежем разрезе мяса. При этом устанавливают наличие липкости путем ощупывания и увлажненность поверхности мяса на разрезе путем приложения к разрезу кусочка фильтровальной бумаги.

Определение консистенции. На свежем разрезе туши или испытуемого образца легким надавливанием пальца образуют ямку и следят за её выравниванием.

Определение запаха. Органолептически устанавливают запах поверхностного слоя туши или испытуемого образца. Затем чистым ножом делают разрез и сразу определяют запах в глубинных слоях. При этом особое внимание обращают на запах мышечной ткани, прилегающей к кости.

Определение состояния жира. Состояние жира определяют в туше в момент отбора образцов, устанавливают цвет, запах и консистенцию жира.

Определение состояния сухожилий. Состояние сухожилий определяют в туше в момент отбора образцов. Ощупыванием сухожилий устанавливают их упругость, плотность и состояние суставных поверхностей.

Определение прозрачности и аромата бульона. Для получения однородной пробы каждый образец отдельно пропускают через мясорубку с диаметром отверстий решетки 2 мм и фарш тщательно перемешивают. Берут 20 г полученного фарша, взвешивая его на лабораторных весах с погрешностью не более 0,2 г, и помещают в коническую колбу вместимостью 100 см³, заливают 60 см³ дистиллированной воды, тщательно перемешивают, закрывают часовым стеклом и ставят в кипящую водяную баню.

Запах мясного бульона определяют в процессе нагревания до 80-85 °С в момент появления паров, выходящих из приоткрытой колбы. Для определения прозрачности 20 см³ бульона наливают в мерный цилиндр вместимостью 25 см³, имеющий диаметр 20 мм, и устанавливают степень его прозрачности визуально.

По результатам испытаний делают заключение о свежести мяса или субпродуктов в соответствии с характерными признаками, предусмотренными в таблица 1.

Мясо или субпродукты, отнесенные к категории сомнительной свежести хотя бы по одному признаку, подвергают химическим и микроскопическим анализам по ГОСТ 23392-2016.

Мясо свежее с поверхности имеет сухую корочку. Цвет мяса бледно-розовый или бледно-красный. Поверхность разреза слегка влажная, но не липкая, с характерным для каждого вида животного цветом. Мясной сок прозрачный. Консистенция мышц упругая. Запах мяса приятный, специфический для каждого вида животного.

Жир в мясе крупного рогатого скота белый, желтоватый или желтый. Консистенция плотная, при раздавливании крошится. Запах отсутствует. Жир свиной белый, иногда бледно-розового цвета, мягкий, эластичный. Запах отсутствует. Жир баранов и овец белого цвета. Сухожилия упругие, плотные, суставные поверхности гладкие, блестящие. Синовиальная жидкость прозрачная. Мозг заполняет всю полость трубчатых костей, он упругий, желтого цвета, на изломе блестящий, не отстает от краев кости.

Мясо сомнительной свежести с поверхности покрыто заветрившейся корочкой или слизью и прилипает к пальцам. Иногда мясо с поверхности покрыто плесенью. Цвет корочки подсыхания – темный. Поверхность разреза по сравнению со свежим мясом более темного цвета, влажная и слегка липкая на ощупь. На фильтровальной бумаге, приложенной к разрезу, остается много влаги. Мясной сок мутный. Консистенция мышечной ткани дрябловатая. При порче мясо приобретает запах кислый, затхлый или гнилостный.

Мясо испорченное (негодное в пищу) с поверхности влажное, липкое, часто покрыто плесенью, цвет серый или зеленоватый. Поверхность разреза липкая и мокрая, цвет матовый, зеленоватый или серый. Консистенция мяса дряблая. Жир серый с грязноватым оттенком, иногда покрыт плесенью. Поверхность слизистая. Запах прогорклый или резко соляный. В случае разложения жира цвет его

зеленоватый с грязным оттенком, мажущейся консистенции. Костный мозг не заполняет всего просвета трубчатой кости. Консистенция мягкая и мажущаяся. Цвет темный, чаще грязно-серый.

Оценку тушек птиц по степени их свежести производят на основе ниже-
следующих показателей: у свежей птицы клюв упругий, сухой и глянцеватый; слизистая оболочка ротовой полости бледно-розового цвета, слегка увлажнена, посторонний запах отсутствует; глазные яблоки выпуклые и заполняют орбиту; кожа на тушке белая или слегка желтоватая; мышечная ткань плотная и упругая. При надавливании пальцем на грудные мышцы образующаяся ямка быстро выравнивается. Запах специфический, соответствует виду птицы; жир белый или желтый, не потускневший, особенно в области шеи и гузки.

Тушки подозрительной свежести характеризуются следующими показателями: клюв тусклый, из ротовой полости ощущается затхлый запах; роговица глаз потускневшая; цвет кожи матовый; на разрезе мышечная ткань плохо обескровлена.

3. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЯСА

3.1 Определение бактериальной обсемененности мяса прямым методом

Определение бактериальной обсемененности мяса прямым методом:

- Микроскопическое исследование мяса.
- Определение КМАФАнМ.
- Определение БГКП.

Микроскопическое исследование мяса

Сохранность мяса во многом зависит от того, сколько микроорганизмов находится на его поверхности, так как со временем они могут размножиться и перейти в глубокие слои. Поэтому исследование начинают с поверхностных слоев. Необходимо сделать препарат для исследования сначала поверхностных, а затем глубоких слоев мяса. Для исследования микроорганизмов, имеющих на поверхности мяса, обожженное предметное стекло прижимают к мясу, чтобы получить отпечаток с поверхностных слоев. Готовые отпечатки, полученные с поверхностных слоев, фиксируют над пламенем спиртовки и окрашивают по Граму. Готовые препараты рассматривают под микроскопом с иммерсией, подсчитывая количество бактерий в поле зрения, и записывают их форму. Исследуют не менее 10 полей зрения. Подсчитывают отдельно грамположительные и грамотрицательные клетки и определяют среднее количество клеток.

Результаты записывают в таблицу 2.

Таблица 2 – Микробиологическая оценка поверхностных слоев мяса

Качество мяса	Количество клеток микроорганизмов в поле зрения	Результаты исследования		Выводы
		Гр(+) клетки, %	Гр(-) клетки, %	
Свежее	Единичные бактерии			
Сомнительной свежести	Десятки бактерий			
Несвежее	Все поле зрения занято бактериями			

Затем к мясу прижимают раскаленный скальпель, убивая находящиеся на его поверхности микроорганизмы, и делают разрез скальпелем на обеззараженном месте. Стерильным пинцетом придерживают мясо в глубине разреза и скальпелем вырезают кусочки, которые кладут на заранее приготовленные обезжженные предметные стекла. Для получения хороших мазков мясо слегка прижимают к стеклам.

Готовые отпечатки, полученные из глубинных слоев мяса, фиксируют над пламенем спиртовки и окрашивают по Граму. Готовые препараты рассматривают под микроскопом с иммерсией, подсчитывая количество бактерий в поле зрения, и записывают их форму. Исследуют не менее 5 полей зрения. Подсчитывают отдельно грамположительные и грамотрицательные клетки и определяют среднее количество клеток. Результаты записывают в таблицу 3.

Таблица 3 – Микробиологическая оценка глубинных слоев мяса

Качество мяса	Количество клеток микроорганизмов в поле зрения	Результаты исследования		Выводы
		Гр(+) клетки, %	Гр(-) клетки, %	
Свежее	Бактерий нет			
Сомнительной свежести	Бактерий нет			
Несвежее	Большое количество Гр(-) и Гр(+) бактерий			

В мазках из свежего мяса в поверхностных слоях встречаются единичные кокки, а в глубоких слоях бактерий нет.

В мазках из мяса сомнительного качества в поверхностных слоях много кокков (несколько десятков в поле зрения) и грамотрицательных бактерий (*Proteus vulgais* и пр.) В глубоких слоях мяса бактерий нет.

В мазках из несвежего мяса обнаруживают большое количество гнилостных палочек (мелких грамотрицательных) и крупных спорообразующих грамположительных различных видов как в поверхностных, так и в глубоких слоях. Такое мясо можно употреблять в том случае, если сохранились хорошие органолептические его свойства и только после длительного проваривания.

**Определение КМАФАнМ (количества мезофильных аэробных
и факультативно-анаэробных микроорганизмов)**

Для определения микробиологических показателей мяса готовят суспензию (рисунок 1), для чего берут пробу с поверхности куска мяса и из глубинных слоев. Взятое мясо отдельно измельчают стерильным ножом или ножницами.

Для посева готовят навеску 10 г и переносят её в колбу со 100 мл физиологического раствора. Колбу встряхивают 1-2 мин круговыми движениями, дают отстояться. Из полученной исходной суспензии готовят ряд десятикратных разведений так, чтобы можно было определить в продукте предполагаемое КМАФАнМ, указанное в нормативных документах на конкретный продукт (рисунок 1).

Для определения КМАФАнМ из каждого разведения по 1 мл высевают в чашки Петри, заливая их питательной средой МПА. Посевы термостатируют при 30 °С в течение 72 ч в аэробных условиях. После термостатирования подсчитывают количество колоний, выросших на чашках Петри. Для подсчета отбирают чашки, на которых выросло от 15 до 300 колоний. Результаты подсчета пересчитывают на 1 г продукта.

Результаты записывают в таблицу 4 и сравнивают с нормативными показателями, имеющимися в СанПиН 2.3.2.1078-01.

Таблица 4 – Микробиологические показатели мяса КМАФАнМ, БГКП по СанПиНу

Вид продукта	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более		Масса продукта, г, в которой не допускается БГКП		Выводы
	норматив	исследование	норматов	исследование	
Мясо свежее парное	$1 \cdot 10^3$		1,0		
Мясо свежее охлажденное в отрубях	$1 \cdot 10^3$		0,1		
Мясо замороженное в отрубях	$1 \cdot 10^4$		0,01		
Полуфабрикаты натуральные	$5 \cdot 10^5$		0,001		
Полуфабрикаты рубленые (фарш)	$5 \cdot 10^6$		0,0001		

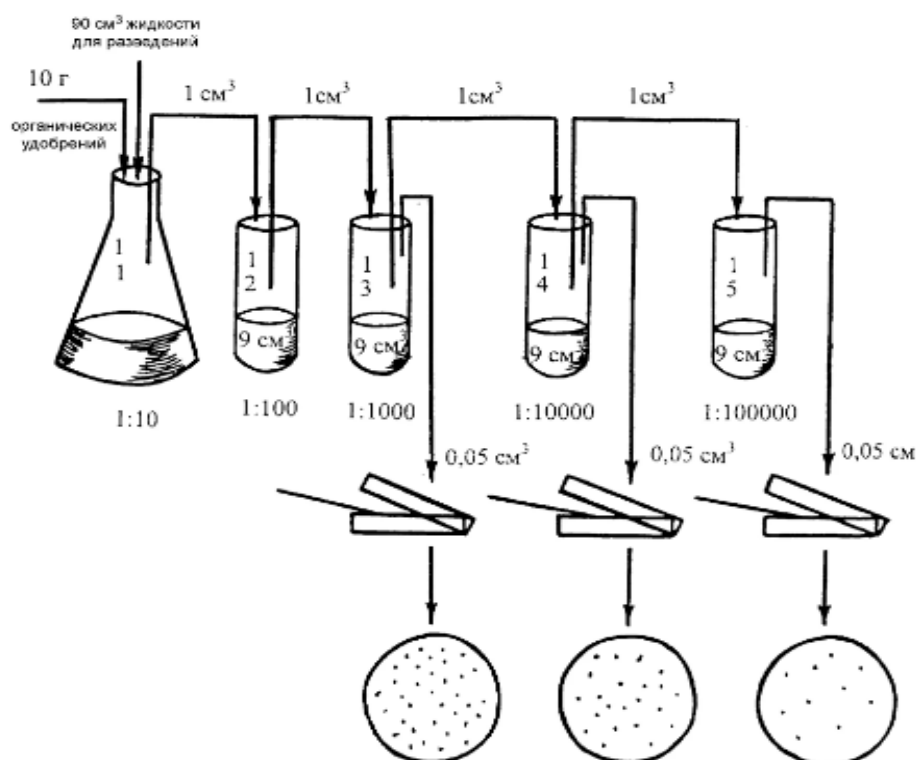


Рисунок 1 – Схема приготовления разведений суспензии мяса и ее посева: в первой пробирке разведение 1:10, во второй 1:100, в третьей – 1: 1000, в четвертой – 1:10000, в колбе – исследуемая суспензия мяса

Превышение гигиенического норматива (свыше $5 \cdot 10^5$) может стать причиной пищевых отравлений у людей. Эти исследования, как мониторинг качества мяса, проводятся ветеринарной службой.

Определение БГКП

Для определения количества бактерий группы кишечных палочек стерильной пипеткой берут по 1 мл исходной суспензии и соответствующих разведений и переносят в жидкую селективную среду Кесслера. Посевы термостатируют при 36°C в течение 24 ч. Положительными считают посевы в жидкую среду, в которой наблюдается интенсивный рост микроорганизмов, проявляющийся в помутнении среды, образовании газа, подкислении среды и как следствие, изменении её цвета.

При необходимости, для подтверждения принадлежности микроорганизмов, выросших на жидких средах, к колиформным бактериям, делают пересевы

на агаризованную среду Эндо. Посевы термостатируют при 36 °С в течение 24 ч. На среде Эндо колиформные бактерии образуют колонии розового или красного цвета, часто с металлическим блеском.

Результаты записывают в таблице 4. Сравнив полученные результаты с нормативными данными, необходимо сделать вывод о свежести мяса.

3.2 Определение бактериальной обсемененности мяса косвенными методами

Определение бактериальной обсемененности мяса косвенными методами:

- Определение реакции мяса.
- Проба на редуктазу.
- Пробная варка мяса.
- Проба на аммиак.

Определение реакции мяса

В свежем мясе реакция среды слабокислая, а в несвежем идет процесс распада белка под действием протеолитических ферментов микроорганизмов, в результате чего выделяется аммиак, и реакция среды становится щелочной.

Для проверки реакции мяса делают разрез и помещают в него смоченную дистиллированной водой лакмусовую бумажку, которую слегка прижимают к мясу. Через несколько минут сравнивают цвет бумажки с контрольной. В щелочной среде розовая бумажка синееет, а в кислой – краснеет.

Определить реакцию мяса можно с помощью универсального индикатора, изменение цвета которого точно укажет на качество мяса. Для этого 1 г мяса без жира и сухожилий разрезают на мелкие кусочки, помещают в пробирку и наливают 10 мл дистиллированной воды. Пробирки дают постоять 15 мин, периодически встряхивая ее, затем отливают 1 мл полученной вытяжки и определяют реакцию мяса (таблица 5).

Таблица 5 – Определение реакции мяса и его качества с помощью универсального индикатора

Цвет индикатора	Реакция мяса	Качество мяса
Красный	4,2 и ниже	4,2-6,1. Мясо хорошего качества
Красно-оранжевый	4,2 – 4,6	
Оранжевый	4,6 – 5,1	
Желтый	5,1 – 6,1	
Желто-зеленый	6,1- 6,4	6,1-7,0. Мясо сомнительного качества
Зеленый	6,4 – 7,1	
Зелено-синий	7,2 – 7,6	7,2-7,6. Мясо плохого качества

Проба на редуктазу

Находящиеся в мясе бактерии выделяют ферменты окислительно-восстановительной группы, в частности, редуктазу. Определить бактериальную обсемененность мяса можно не прямым подсчетом количества бактерий, а косвенно, через пробу на редуктазу. Для этого в пробирку помещают 1 г разрезанного на кусочки мяса, заливают 5 мл дистиллированной воды, хорошо встряхивают и оставляют на 30 мин до получения вытяжки. По истечении указанного времени в пробирку добавляют 0,1 см 1%-го раствора метиленовой сини и ставят пробирку в водяную баню при температуре 45 °С. Если через 1 ч метиленовая синь не обесцветится, значит, в пробе мало фермента редуктазы, следовательно, мало бактерий. Мясо считается хорошего качества. Если метиленовая синь обесцвечивается быстро, значит, в пробе много редуктазы и мясо плохого качества.

Пробная варка мяса

О качестве мяса можно судить по образующемуся бульону. Для проведения этой пробы небольшие кусочки мяса помещают в пробирку, заливают 3 мл дистиллированной воды и нагревают до кипения. Если мясо свежее, то бульон при варке будет прозрачным и ароматным. Если мясо сомнительного качества, бульон будет мутным, запах затхлый. При варке несвежего мяса образуется грязный бульон с хлопьями и гнилостным запахом.

Проба на аммиак

В свежем мясе не происходит гнилостных процессов, вызываемых бактериями – аммонификаторами, и не образуется конечный продукт распада белка – аммиак. Уловить аммиак можно с помощью реактивной смеси одна часть двуокиси марганца и две части 5%-го раствора соляной кислоты или 0,1%-й раствор перманганата калия 1 л + 5 мл концентрированной серной кислоты, в присутствии которой из аммиака образуется хлористый аммоний.

Для обнаружения аммиака небольшой кусочек мяса накалывают на препаровальную иглу и опускают в пробирку с реактивной смесью, держа на высоте 1 см от жидкости. При наличии в мясе аммиака вокруг кусочка образуется облачко хлористого аммония.

По результатам проведенных анализов дают заключение о качестве мяса и его пригодности для употребления в пищу.

Определение аммиака реактивом Несслера (капельный метод)

Для приготовления фильтрата – экстракта для исследования с поверхности мяса срезают кусочек, освобождают его от жира и сухожилий. Взвешивают 10 г, мелко нарезают и заливают 100 мл дисциллированной воды, энергично встряхивают. Через 15 мин фильтруют через бумажный фильтр.

Реакцию ставят в двух пробирках: в первую – наливают 1 мл мясного фильтрата-экстракта, во вторую – 1 мл дистиллированной воды (контроль). Реактив Несслера (щелочной водный раствор дигидрата тетраиодомеркурата калия) вносят в пробирки по каплям. Изменение цвета и появление осадка учитывают после добавления каждой капли. Результат оценки реакции указывают крестами (таблица 6).

Реакция определения аммиака реактивом Несслера является демонстративной и может служить одним из критериев при оценке качества мяса.

Таблица 6 – Определение качества мяса по реакции на аммиак с реактивом Несслера

Число капель реактива	Изменение цвета и выпадение осадка	Примерное содержание аммиака, мг%	Оценка реакции	Качество мяса
10	Цвет не меняется, помутнения и осадка нет	До 16	-	Свежее
10	Пожелтение и слабое помутнение, осадка нет	16-20	\pm	Начальная стадия порчи, мясо подлежит немедленной реализации
10	Пожелтение, слабое помутнение и слабый осадок	21-30	+	
6-9	Пожелтение или оранжевый оттенок и осадок	31-45	++	Условно годное, немедленная реализация после зачистки подозрительных участков
1-5	Резкое пожелтение или оранжево-красный цвет и осадок	Более 45	+++	Негодное, подлежит технической утилизации

4. МЕТОДЫ СОХРАНЕНИЯ ДОБРОКАЧЕСТВЕННОСТИ МЯСА

К методам сохранения доброкачественности мяса можно отнести: термическую обработку, консервирование, посол мяса (сухой, мокрый, смешанный), вяление, сушку, копчение (холодное и горячее), холодильную обработку, замораживание, охлаждение, маринование. Все эти методы сохранения мяса детально рассматриваются при изучении дисциплины «Технология производства, переработки, хранения продукции животноводства».

Вопросы для самоконтроля

- 1. Мясо как питательная среда для микроорганизмов.*
- 2. Источники эндогенного обсеменения мяса.*
- 3. Источники экзогенного обсеменения мяса*
- 4. Исследование органолептических свойств мяса.*
- 5. Микроскопическое исследование мяса.*
- 6. Методы сохранения доброкачественности мяса.*

Среда Кесслера

Среда предназначена для выделения и дифференциации энтеробактерий по признаку ферментации лактозы при санитарных исследованиях продуктов питания, сырья и объектов внешней среды.



Среда Кесслера

Состав (г/л):

Пептон (пептический перевар животной ткани)	7,00
Дрожжевой экстракт	3,00
Лактоза	10,00
Смесь желчных кислот	1,50
Натрия хлорид	5,00
Нейтральный красный	0,03
Кристаллический фиолетовый	0,002
Конечное значение pH (при 25°C)	7,4 ± 0,2

Селективные (избирательные) свойства среды связаны с присутствием ингибиторов роста – желчных солей и кристаллического фиолетового. Последний подавляет рост грамположительных микроорганизмов, в частности стафилококков. Бактерии, быстро ферментирующие лактозу, образуют красные колонии, окруженные красно-лиловым ореолом. У бактерий, не ферментирующих или медленно ферментирующих лактозу, колонии бледные. Рост других грамотрицательных бактерий можно подавлять инкубированием при температуре выше 42

°С или в анаэробных условиях. Для повышения специфичности применяют двухслойный метод посева. Инкубировать посевы можно при температуре выше 42 °С в течение 18 ч, при 32 °С – в течение 24-48 ч или при 4 °С в течение 10 дней.

Внешний вид среды: гомогенный сыпучий порошок желтого цвета. Готовая среда имеет красновато-лиловую окраску, прозрачна или слегка опалесцирует, если в чашках Петри формируется гель.

Кислотность среды: при 25 °С водный раствор (2,65% вес/об) имеет рН 7,4±0,2. Культуральные свойства для микроорганизмов: ростовые характеристики референс-штаммов через 18-24 ч при 35 °С.

Условия и сроки хранения: порошок хранить при температуре ниже +25 °С; использовать до даты, указанной на этикетке; готовую среду хранить при температуре +2...8 °С.

Приготовление: препарат в количестве 23,0 г размешивают в 1 л дистиллированной воды, нагревают до кипения и кипятят в течение 2-3 мин. Горячую среду фильтруют через ватно-марлевый или бумажный фильтр и разливают по 5 мл в стерильные пробирки с поплавками. Среду в пробирках стерилизуют автоклавированием при температуре 112 °С в течение 20 мин. Готовая среда имеет фиолетовый цвет.

Среда Эндо

Среда Эндо – дифференциально-диагностическая питательная среда, предназначенная для выделения энтеробактерий. Названа по имени предложившего её японского бактериолога Шигеру Эндо (1869-1937). Обладает слабыми селективными свойствами, компоненты среды подавляют рост грамположительных бактерий.

Состав (г/л):

Питательный агар сухой	26,5
Витаминный препарат «ЭКД»	1,22
Фуксин основной	0,23
Сахар молочный	10,7

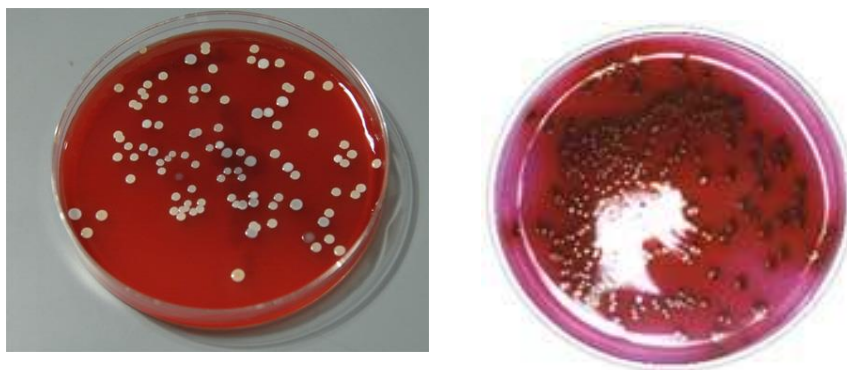
Динатрия фосфат	0,48
Сульфит натрия безводный	0,83
Натрий углекислый	0,03
Лактоза	10,0

Принцип действия: фуксин обесцвечивается сульфитом натрия (образуется бесцветная фуксинсернистая кислота – реактив Шиффа). Энтеробактерии, сбраживающие лактозу, в процессе брожения выделяют муравьиную кислоту, которая даёт цветную реакцию с реактивами на альдегиды, в том числе и с фуксин-сернистой кислотой с образованием свободного фуксина, в результате чего их колонии окрашиваются в малиново-красный цвет с металлическим блеском или без него. Колонии бактерий, не сбраживающих лактозу, имеют белый или слабо-розовый цвет (цвет питательной среды).

Кислотность среды: рН $7,4 \pm 0,2$.

Способ приготовления: 40 г (точную навеску см. на упаковке) агара Эндо растворить в 1 л дистиллированной воды, прокипятить до полного расплавления агара 2-3 мин, профильтровать и снова довести до кипения, остудить до температуры $45-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, разлить в стерильные чашки Петри слоем 3-4 мм, после застывания подсушить при температуре $37 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 40-60 минут.

Условия и сроки хранения: Готовую питательную среду необходимо использовать в день приготовления. Хранить до посева в темноте. Агар Эндо гигроскопичен, светочувствителен. Хранить герметически закрытым в помещении с относительной влажностью воздуха не более 60% и температурой от 2 до $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.



*Чашки Петри с питательной средой Эндо
и выросшими на них колониями*

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Санитарная микробиология учебное пособие / Р.Г. Госманов, А.Х. Волков, А.К. Галиуллин, А.И. Ибрагимова. – 3-е изд., стер. – Санкт-Петербург: Лань, 2021. – 252 с. – ISBN 978-5-8114-1094-1. – Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/169095>
2. Микробиология: учебник / О.Д. Сидоренко, Е.Г. Борисенко, А.А. Ванькова, Л.И. Войно. – М.: ИНФРА-М, 2020. – 286 с. – (Высшее образование: Бакалавриат). – ISBN 978-5-16-009743-5. – Текст: электронный. – URL: <https://znanium.com/catalog/product/1227524>
3. Гернет, М. В. Микробиология: Учебник / Гернет М.В., Ильяшенко Н.Г., Шабурова Л.Н. – М.:НИЦ ИНФРА-М, 2020. – 263 с. (Высшее образование: Бакалавриат). – ISBN 978-5-16-015357-5. – Текст: электронный. – URL: <https://znanium.com/catalog/product/1081661>
4. Микробиология: руководство к лабораторным занятиям: учебно-методическое пособие / М.С. Пономарева, Л.Н. Шабурова, Н.Г. Ильяшенко, М.В. Гернет. – М.: ИНФРА-М, 2021. – 246 с.: ил. – (Высшее образование: Бакалавриат, Магистратура). – ISBN 978-5-16-017113-5. – Текст: электронный. – URL: <https://znanium.com/catalog/product/1764800>
5. Кисленко, В. Н. Микробиология. Практикум: учебное пособие / В.Н. Кисленко. – М.: ИНФРА-М, 2020. – 239 с. – (Среднее профессиональное образование). – ISBN 978-5-16-016186-0. – Текст: электронный. – URL: <https://znanium.com/catalog/product/1085571>
6. Ильяшенко, Н.Г. Микроорганизмы и окружающая среда: учеб. пособие / Н.Г. Ильяшенко, Л.Н. Шабурова. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ИНФРА-М, 2019. – 195 с. – (Высшее образование: Бакалавриат). – www.dx.doi.org/10.12737/25060. – ISBN 978-5-16-012636-4. – Текст: электронный. – URL: <https://znanium.com/catalog/product/1031519>
7. Асонов Н.Р. Микробиология. – М., 2001. – 352 с.
8. Асонов Н.Р. Практикум по микробиологии. – М.: Агропромиздат, 1988.

9. *Богданов В.М.* Техническая микробиология пищевых продуктов / В.М. Богданов и др. // Пищевая промышленность. – М., 1968.
10. ГОСТ 7269-2015. Мясо. Методы отбора образцов и органолептические методы определения свежести. – М.: Стандартинформ, 2019. – 11 с.
11. ГОСТ 21237-75. Мясо. Методы бактериологического анализа. – М. Стандартинформ, 2006. – 27 с.
12. ГОСТ Р 50455-92 (ИСО 3565-75). Мясо и мясные продукты. Обнаружение сальмонелл (арбитражный метод). – М. Стандартинформ, 2010. – 13 с.
13. *Ежов Г.И.* Руководство к практическим занятиям по сельскохозяйственной микробиологии. – М.: Высш. шк., 1981. – 271 с.
14. *СанПиН 2.3.2.1078-01* Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. – М., 2002. – 269 с.
15. *Сидоров М.А.* Микробиология мяса и мясопродуктов / М.А. Сидоров, Р.П. Корнелаева. – М.: Колос, 1998. – 240 с.
16. *Сидоров М.А.* Практикум по микробиологии мяса и мясных продуктов / М.А. Сидоров, С.В. Нецепляева, Р.П. Корнелаева. – М.: Колос, 1996.
17. *Сидоров М.А.* Микробиология мяса, мясопродуктов и птицепродуктов. М.А. Сидоров, Н.В. Билетова. – М.: Агропромиздат, 1986. – 208 с.
18. *Теппер Т.П.* Практикум по микробиологии / Т.П. Теппер и др. – М.: Дрофа 2004. – 256 с.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
1. Основные источники обсеменения мяса.....	6
2. Методы отбора образцов и органолептические методы определения све- жести мяса (ГОСТ 7269-79).....	10
2.1 Отбор образцов.....	10
2.2 Органолептическая оценка мяса.....	10
3. Микробиологическое исследование мяса.....	15
3.1 Определение бактериальной обсемененности мяса прямым методом.. Микроскопическое исследование мяса.....	15 15
Определение КМАФАнМ (количества мезофильных аэробных и фа- культативно-анаэробных микроорганизмов).....	17
Определение БГКП.....	18
3.2. Определение бактериальной обсемененности мяса косвенным мето- дом.....	19
Определение реакции мяса.....	19
Проба на редуктазу.....	20
Пробная варка мяса.....	20
Проба аммиака.....	21
4. Методы сохранения доброкачественности мяса.....	23
Приложение.....	24
Библиографический список.....	27

Литвина Лидия Алексеевна
Анфилофьева Ирина Юрьевна

Микробиологическое исследование мяса

Методические указания для
лабораторно-практических занятий

Печатается в авторской редакции
Оператор электронной верстки Н.Е. Карачева

Подписано в печать _____ г.
Формат $60 \times 84 \frac{1}{16}$. Объем _____ уч.-изд. л., 1,9 усл. печ. л.
Тираж _____ экз. Изд. № ____ . Заказ № _____

Отпечатано в Издательстве
Новосибирского государственного аграрного университета
630039, Новосибирск, ул. Добролюбова, 160, каб. 106.
Тел./факс (383) 267–09–10. E-mail: 2134539@mail.ru