



## Ćwiczenie 11 i 12

### **Temat: Mikroflora surowców pochodzenia zwierzęcego i jej wpływ na jakość gotowego produktu**

Według obowiązujących przepisów w żywności oznacza się grupy drobnoustrojów określane jako wskaźniki higieny procesu oraz wskaźniki bezpieczeństwa produktu.

Producenci żywności mając na uwadze zapewnienie właściwej jakości produktów oraz ich trwałość mimo braku wymagań prawnych poszerzają zakres analiz o oznaczanie grup drobnoustrojów mogących ze względu na swój metabolizm powodować wady produktów lub znacznie skracać jego termin przydatności do spożycia.

Przed podjęciem decyzji o zakresie wykonywanych analiz mikrobiologicznych żywności trzeba dobrze poznać specyfikę produktu (rodzaj i jakość surowców używanych do jego produkcji, proces technologiczny, sposoby przechowywania).

W produktach fermentowanych nie oznacza się liczby mezofilnych bakterii tlenowych, ponieważ na agarze odżywczym może wyrosnąć obok drobnoustrojów zanieczyszczających produkt część mikroflory technologicznej (mikroflora szczepionek lub zakwasów). Natomiast bardzo często oznacza się w tej żywności liczbę drobnoustrojów dodanych jako szczepionki, np. w jogurcie oznacza się liczbę *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. W ostatnim dniu trwałości jogurtu, liczba tych bakterii nie powinna być mniejsza niż  $10^7$  kom/cm<sup>3</sup>.

Z kolei w produktach przechowywanych chłodniczo znacznie więcej informacji dostarcza poziom zanieczyszczenia drobnoustrojami psychrotrofowymi niż liczba mezofilnych bakterii tlenowych, np. przy przechowywaniu mięsa drobiowego w temperaturze 2°C bakterie psychrotrofove i psychrofilne stopniowo opanowują to środowisko i mogą stanowić nawet 96% ogólnej liczby drobnoustrojów.

W produktach o znacznie obniżonej aktywności wody, np. w przyprawach najczęściej główną mikroflorę stanowią przetrwalniki *Bacillus* sp. i *Clostridium* sp. oraz zarodniki grzybów.

### **MIEŚO ZWIERZĄT RZEŹNYCH**

Przy prawidłowym uboju, prowadzonym w dobrych warunkach higienicznych głębokie partie mięśni są jałowe lub wykazują obecność nielicznych ziarniaków z rodzaju *Micrococcus*. Na powierzchni tusz mikroflora jest liczniejsza, a stanowią ją bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne. Przy bardzo dobrej higienie uboju i obróbki tusz liczebność bakterii waha się w granicach 100-900 kom/g lub cm<sup>2</sup>.

Psucie mięsa powodują najczęściej tlenowe pałeczki Gram-ujemne, zwykle psychrotrofove – przy zanieczyszczeniu rzędu  $10^6$  kom/g lub cm<sup>2</sup> występują już wyczuwalne zmiany zapachowe.

Mięso jako surowiec nie podlega ocenie mikrobiologicznej. W przypadkach, gdy jakość surowca budzi wątpliwości, można przeprowadzić ocenę jego świeżości na podstawie obrazu mikroskopowego powierzchni.

Jakość mikrobiologiczną przetworów mięsnych kształtują przede wszystkim występujące w nich przy nie spełnieniu wymagań higienicznych wskaźniki higieny procesu



(*Enterobacteriaceae*). Bardzo ważnym kryterium jakości przetworów jest brak mikroflory chorobotwórczej. Ze względu na aktywność enzymów proteolitycznych i lipolitycznych istotnym kryterium jakości są bakterie psychrotrofowe, które mogą zanieczyszczać wyroby przechowywane chłodniczo. W przypadku wędlin fermentowanych jakość finalnego produktu w największym stopniu jest uzależniona od prawidłowo dobranej kultury starterowej, aktywności jej komponentów i warunków procesu fermentacji i dojrzewania.

## RYBY I PRZETWORY RYBNE

Mikroflora ryb i produktów rybnych zależy od wielu czynników: zanieczyszczenia bakteryjnego surowca, rodzaju połowu, stanu higienicznego i jakości sprzętu używanego do połowu. Do wtórnych zanieczyszczeń dochodzi często podczas sprawiania ryb, transportu, kontaktu z materiałem do pakowania. Ryby mogą być źródłem zróżnicowanej mikroflory saprofitycznej i chorobotwórczej. Najczęściej izolowana jest mikroflora psychrofilna z gatunków: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Micrococcus*. Do tkanek ryb mnoga przenikać i inicjować procesy rozkładu mezofilne bakterie gnilne np. *Proteus* sp., *Serratia* sp., *Bacillus* sp. pochodzące ze środowiska, w którym umieszczono ryby po złowieniu. W tkankach ryb mogą także być obecne drobnoustroje chorobotwórcze: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*. Zagrożeniem zdrowia konsumenta może być także nadmierna koncentracja histaminy w mięśniach ryb np. makreli lub łososiowatych. Histamina powstaje na skutek dekarboksylacji L-histydyny przeprowadzanej przez pałeczki *Proteus* sp., *Hafnia* sp., *P. fluorescens*, *Micrococcus* sp. Histamina jest ciepłooporna i jej ogrzewanie podczas przygotowywania posiłków do konsumpcji nie powoduje jej inaktywacji.

Ryby bezpośrednio po połowie należy zabezpieczyć przed zepsuciem. W tym celu stosowane są różne metody biologiczne, chemiczne lub fizyczne. Zabezpieczenie metodami chemicznymi polega na stosowaniu soli kuchennej lub konserwantów. W metodzie biologicznej ryby utrzymuje się przy życiu transportując je w wodzie. Fizyczne metody polegają na obniżeniu temperatury ryb poprzez schłodzenie, lodowanie lub zamrożenie. Lód powinien być produkowany wyłącznie z wody zdatnej do picia, ze względu na bezpośredni kontakt z surowcem. Istnieje bezpośrednia zależność pomiędzy stopniem obniżania temperatury tkanki mięśniowej a jej trwałością (tab. 1). Trwałość ryb ulega przedłużeniu także przy pakowaniu ich w folie gazoszczelne o zmodyfikowanej atmosferze (MAP).

Tab. 1 Wpływ czasu chłodzenia ryb w wodzie na liczbę komórek bakterii.

Temperatura wody [°C]	Czas przetrzymywania ryb [godz.]	Liczba bakterii [kom./g]
0	0	3 800 000
3	3	5 400 000
5	6	9 000 000
6	15	25 000 000



**Przetwory z ryb** to produkty wytworzone z ryb, wzbogacone w różne dodatki, które powinny zawierać co najmniej 50% mięsa ryb. W wyniku procesu przetwórczego uzyskują właściwości sensoryczne umożliwiające ich bezpośrednie spożywanie. Do przetworów rybnych zaliczmy m.in.: ryby wędzone, marynaty rybne, rybne przetwory garmażeryjne.

Wyróżnia się dwa asortymenty ryb wędzonych – wędzone na gorąco i wędzone na zimno. Do wędzenia na gorąco używane są świeże albo mrożone ryby, solone. Wędzenie odbywa się w wysokiej temperaturze: 82,2°C/ 30min. Ryby wędzone na zimno poddawane są działaniu dymu o temperaturze 28-30°C. Bakterie powodujące psucie się ryb wędzonych to przede wszystkim *Micrococcus* sp. i *Pseudomonas* sp., nierzadko również pleśnie (obecne w drewnie używanym do wytworzenia dymu). Bakteriami chorobotwórczymi stwierdzonymi w rybach wędzonych są pałeczki *Salmonella* i laseczki jadu kiełbasianego *Clostridium botulinum*.

Marynaty rybne otrzymuje się w wyniku poddaniu mięśni ryb działaniu kwasu octowego. Najpierw przez kilka dni mięśnie ryb dojrzewają w kąpeli roztworu soli i kwasu octowego. Po uzyskaniu właściwych cech dodaje się do nich przyprawy i warzywa, a następnie uzupełnia zalewa z soli kuchennej, kwasu octowego, cukru i wody. Powodem psucia się marynat jest najczęściej namnożenie się heterofermentatywnych bakterii fermentacji mlekowej z gatunków: *L. brevis*, *L. buchneri*, *Leuconostoc mesenteroides*. W środowisku marynat ze względu na niskie pH (zwykle poniżej 5,0) nie ma warunków do rozwoju pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*.

Rybne przetwory garmażeryjne to potrawy w postaci półproduktów lub produktów gotowych, z których można szybko przyrządzić posiłki. Jakość tych produktów zależy od jakości ryb, ich rozdrobnienia oraz higieny uzyskiwania. Powodem psucia się produktów garmażeryjnych jest ich przechowywanie ich w zbyt wysokich temperaturach umożliwiających namnożenie się bakterii psychrofilnych (pochodzących najczęściej z zakażeń wtórnych), najczęściej pałeczki *Proteus* sp. oraz laseczki *Bacillus subtilis*.

## MLEKO I PRZETWORY MLECZNE

Mleko surowe, ze względu na swój skład chemiczny, stanowi bardzo dobrą pożywkę do rozwoju mikroorganizmów. Bezpośredni wpływ na stan mikrobiologiczny i higieniczny mleka mają takie czynniki, jak stan zdrowotny gruczołu mlekowego, warunki higieniczne w oborze oraz higiena doju. Warunki przechowywania mleka u producenta oraz warunki transportu do mleczarni wpływają dodatkowo na mikrobiologiczne zanieczyszczenia mleka.

Typową mikroflorę surowego mleka stanowią bakterie kwaszące (bakterie fermentacji mlekowej), pałeczki grupy coli, bakterie ciepłooporne, bakterie psychrotrofowe oraz bakterie proteolityczne i lipolityczne. Grzyby występują w mleku w bardzo małych ilościach i nie mają wpływu na jego jakość. W przypadku braku przestrzegania higienicznych warunków pozyskiwania mleka, z surowca takiego izoluje się również bakterie chorobotwórcze. Bezpośrednio po doju wzrost bakterii w mleku jest hamowany lub ograniczany przez naturalne substancje bakteriostatyczne, do których należą immunoglobuliny mleka (lakteniny), system laktoperoksydaza – tiocjaniany – nadtlenek wodoru, laktoferyna



i lizozym. Jednak skuteczne działanie bakteriostatyczne widoczne jest tylko przy małym zanieczyszczeniu mleka bakteriami. Większość tych związków jest termostabilna w temperaturze 72°C i pozostaje aktywna w mleku poddanym łagodnej pasteryzacji, co może w pewnym stopniu ograniczać rozwój bakterii zakwasów mleczarskich. Mleko złej jakości mikrobiologicznej może zawierać inne związki hamujące rozwój lub aktywność bakterii zakwasów. Są to między innymi kwasy tłuszczowe uwalniane z tłuszczu mlekowego przez bakterie lipolityczne lub bakteriocyny produkowane przez bakterie fermentacji mlekowej.

Podczas leczenia stanów zapalnych wymion do mleka dostają się również antybiotyki i sulfonamidy, które wpływają na obniżenie aktywności fermentacyjnej bakterii wchodzących w skład zakwasów lub wręcz hamują ich rozwój.

Znajomość mikroflory, która może wystąpić w surowcu jest bardzo istotna i pozwala na odpowiedni dobór parametrów technologicznych, tak aby produkt finalny charakteryzowała odpowiednia trwałość i przede wszystkim bezpieczeństwo spożycia.

Mikroflorę produktów mlecznych niefermentowanych stanowi tzw. mikroflora reszkowa oraz mikroflora z reinfekcji, spośród której za główną przyczynę wad można uznać pałeczki grupy coli. Jakość mikrobiologiczna wyrobów fermentowanych kształtowana jest przede wszystkim; przy założeniu, że proces fermentacji przebiegał bez zakłóceń; przez mikroflorę zanieczyszczeń wtórnych. W produktach tych przy ocenie jakości uwzględnia się głównie liczbę pałeczek *Enterobacteriaceae*, grzybów i obecność mikroflory chorobotwórczej.

## DRÓB

Dominującą mikroflorę saprofityczną drobiu stanowią Gram-ujemne pałeczki *Pseudomonas* sp., *Moraxella* sp., *Enterobacteriaceae* oraz drożdże. Jakość mikrobiologiczna drobiu i przetworów jest jednak kształtowana przede wszystkim przez ewentualnie obecną mikroflorę patogenną, do której zalicza się: *Salmonella* sp., *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens* oraz chorobotwórcze serotypy *Escherichia coli*. Dobierając technologię i parametry procesów w produkcji wyrobów z mięsa drobiowego zwraca się szczególną uwagę na eliminację mikroflory patogennej.



## CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

### 1. Wykonanie badań mikroskopowych surowców

Czyste szkiełko przedmiotowe przyłożyć do powierzchni badanego mięsa i lekko przycisnąć. Uzyskany preparat odciskowy wysuszyć, utrwalić (w razie potrzeby odtłuścić w chloroformie) i zabarwić metodą Grama. Przeprowadzić obserwacje mikroskopowe (pod immersją) w co najmniej 20 polach widzenia.

### Ocena świeżości mięsa na podstawie obrazu mikroskopowego powierzchni

<b>brak bakterii lub obecne pojedyncze ziarniaki Gram-dodatnie</b>	mięso świeże (pH 5,8-6,5)
<b>w polu widzenia 20-30 ziarniaków, nieliczne pałeczki Gram-ujemne</b>	mięso o podejranej świeżości (pH 6,6)
<b>w polu widzenia liczne bakterie z przewagą pałeczek Gram-ujemnych</b>	mięso nieświeże (pH $\geq$ 6,7)

### 2. Mikrobiologiczna analiza produktów pochodzenia zwierzęcego (każde stanowisko bada jedną próbkę)

Produkty stałe zostały odważone w ilości 10g do jałowego worka. Należy wykonać rozcieńczenie 1:10. W tym celu przelać do worka 90cm<sup>3</sup> jałowego płynu fizjologicznego i ujednoczyć próbkę w stomacherze. Całość przelać z powrotem do kolby po płynie fizjologicznym. Następnie wykonać kolejne rozcieńczenia i przeprowadzić odpowiednie oznaczenia.

#### a. Ser dojrzewający

- liczba drożdży i pleśni – posiew metodą wgłębną w 2 powtórzeniach roz. 1 i 2
- obecność beztlenowych, przetrwalnikujących laseczek sacharolitycznych (w 0,1 g)
- liczba pałeczek grupy coli – posiew metodą wgłębną w 2 powtórzeniach roz. 1

#### b. Jogurt nietermizowany

- liczba drożdży i pleśni – posiew metodą wgłębną w 2 powtórzeniach roz. 1
- liczba pałeczek *Lactobacillus* sp. – posiew metodą powierzchniową, bez powtórzeń roz. 4 i 5
- liczba pałeczek grupy coli – posiew metodą wgłębną w 2 powtórzeniach roz. 1



c. *Mleko spożywcze pasteryzowane (próbka mleka będzie przygotowana w jałowej kolbce)*

- ogólna liczba drobnoustrojów – posiew metodą wgłębną w 2 powtórzeniach roz. 2 i 3
- obecność pałeczek grupy coli (w 0,1 cm<sup>3</sup>)
- liczba bakterii ciepłoopornych – posiew (po pasteryzacji w jałowej probówce) metodą wgłębną, bez powtórzeń roz. 1 i 2

d. *Ryba wędzona*

- ogólna liczba drobnoustrojów – posiew metodą wgłębną w 2 powtórzeniach roz. 2 i 3
- obecność pałeczek grupy coli (w 0,1 g)
- liczba drożdży i pleśni – posiew metodą wgłębną w 2 powtórzeniach roz. 1

e. *Ryba w zalewie octowej*

- ogólna liczba drobnoustrojów – posiew metodą wgłębną w 2 powtórzeniach roz. 2 i 3
- obecność pałeczek grupy coli (w 0,1 g)
- liczba drożdży i pleśni – posiew metodą wgłębną w 2 powtórzeniach roz. 2 i 3

f. *Kielbasa parzona*

- ogólna liczba drobnoustrojów – posiew metodą wgłębną w 2 powtórzeniach roz. 2 i 3
- obecność pałeczek grupy coli (w 0,1 g)
- liczba drożdży i pleśni – posiew metodą wgłębną w 2 powtórzeniach roz. 1

g. *Kielbasa fermentowana typu salami*

- liczba pałeczek *Lactobacillus* sp. – posiew metodą powierzchniową, bez powtórzeń roz. 4 i 5
- liczba pałeczek grupy coli – posiew metodą wgłębną w 2 powtórzeniach roz. 1
- obecność paciorkowców *Enterococcus* sp. (w 0,1 g)

h. *Kurczak pieczony*

- ogólna liczba drobnoustrojów – posiew metodą wgłębną w 2 powtórzeniach roz. 1 i 2
- obecność pałeczek grupy coli (w 0,1 g)
- liczba drożdży i pleśni – posiew metodą wgłębną w 2 powtórzeniach roz. 1