

## Лекция. Санитарно-микробиологические исследования пищевых продуктов - 20 мая

- 1. Условия сохранения и размножения условно-патогенных и патогенных микробов в пищевых продуктах.**
- 2. Санитарно-микробиологическое исследование молока и молочных продуктов.**
- 3. Санитарно-микробиологическое исследование баночных консервов.**
- 4. Санитарно-микробиологическое исследование мяса, колбасных изделий, рыбы и рыбных продуктов.**

- 1. Условия сохранения и размножения условно-патогенных и патогенных микробов в пищевых продуктах.**

Пищевые продукты играют значительную роль в питании человека и в то же время они наиболее подвержены микробной порче в связи с благоприятным химическим составом и особенно содержанию большого количества воды (скоропортящиеся). Состав микрофлоры зависит от санитарного состояния продукта, условий его производства, перевозки, хранения и реализации. Степень обсеменения подготавливаемого сырья микроорганизмами находится в прямой зависимости от санитарно-гигиенических условий производства. Загрязнение пищевых продуктов токсигенными микроорганизмами может происходить через руки персонала пищевых производств, предприятий торговли и общественного питания, а также через бацилло-, бактерио- и вирусоносителей, работающих в этих сферах; через оборудование на производствах, а также вспомогательные материалы (пряности, соль, сахар, жир-сырец и т.д.), которые всегда содержат микроорганизмы; через воздух производственных помещений; через воду, не отвечающую санитарным требованиям, и полученный из нее лед, соприкасающийся с продуктами при хранении; через загрязненную тару. Плоды, овощи и ягоды загрязняются при выращивании их на почве, удобряемой фекалиями. Мясо и молоко могут быть заражены токсигенной микрофлорой, если они получены от больных животных.

Мышцы здоровых животных и птиц не содержат микроорганизмы. Загрязнение мяса микробами начинается в момент убоя. Кровь, вытекающая из артерий, отчасти засасывается вновь через вены, зияющие в ране и имеющие отрицательное давление. Обсеменение поверхности мяса происходит при снятии шкуры и разделке туши. Особенно сильно загрязняется мясо, если при обработке туши повреждают кишечник. Дальнейшее загрязнение поверхности мяса происходит при его транспортировке и хранении. Микроорганизмы, попавшие в мясо, при благоприятной температуре могут размножаться, поскольку этот продукт является хорошей питательной средой количество их на 1 см<sup>2</sup> поверхности мяса может достигать многих миллионов.

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.

Мышцы рыб, в нормальных условиях стерильны. Порча продукта наступает после гибели рыбы. В отличие от мяса теплокровных животных, порчу которых вызывают преимущественно мезофильные гнилостные микроорганизмы, возбудителями гнилостного разложения рыбы являются чаще психрофильные бактерии, активное размножение которых происходит при низкой температуре. Поэтому рыба представляет продукты еще более подверженные порче, чем мясо животных и птиц.

Микроорганизмы попадают через жабры, кишечник, особенно в период агонии. Микроорганизмы, находящиеся на поверхности тела рыбы, покрытой слизью, являющейся хорошим питательным субстратом для их развития, быстро размножаются и со временем проникают вглубь мягких тканей. Особенно обильно загрязняется рыба при вскрытии брюшка, т.к. при этом неизбежно повреждается кишечник.

## **2. Санитарно-микробиологическое исследование молока и молочных продуктов.**

Молоко и молочные продукты могут содержать различные микроорганизмы. При изготовлении кисломолочных продуктов в молоко после пастеризации добавляют закваску, которая характеризует специфическую микрофлору данного продукта. Неспецифическую микрофлору молока составляют гнилостные микробы, аэробные и анаэробные бациллы, плесени и многие другие. Обсеменение молока микробами происходит уже в процессе дойки, и интенсивность его зависит от соблюдения санитарно-гигиенических условий при получении молока. Плохие условия хранения молока способствуют нарастанию в нем микрофлоры. Патогенные микроорганизмы могут попадать в молоко в процессе его получения и транспортировки из окружающей среды или могут содержаться в молоке больных животных (стафилококки, бруцеллы, микобактерии туберкулеза). Через молоко и молочные продукты могут передаваться возбудители различных заболеваний.

При санитарно-микробиологическом исследовании молока и других молочных продуктов производят определение:

- 1) общего количества бактерий (КМАФАнМ);
- 2) количества БГКП;
- 3) *S. aureus*;
- 4) патогенные микроорганизмы, в т.ч. сальмонеллы;
- 5) для некоторых видов молочных продуктов - *L. monocytogenes*, плесневые грибы и дрожжи;
- 6) по эпидемическим показаниям проводят бактериологическое исследование для выявления возбудителя заболевания, возникновение которого связывают с употреблением данного продукта.

Качество молока и молочных продуктов определяется в соответствии с показателями СанПиН 2.3.2.1078-01 (табл.1).

**Таблица 1. Санитарно-микробиологические нормативы для молока и некоторых видов молочной продукции.**

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/см <sup>3</sup> (г), не более	Масса продукта (г, см <sup>3</sup> ), в которой не допускаются			
		БГКП	Патогенные, в т.ч. сальмонеллы	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Молоко сырое: высший сорт	3 x 10 <sup>5</sup>		25		
первый сорт	5 x 10 <sup>5</sup>		25		
второй сорт	4 x 10 <sup>6</sup>		25		
Молоко, сыворотка молочная, пахта пастеризованные (в потребит/ таре)	1 x 10 <sup>5</sup>	0,01	25	1	25
Сливки пастеризованные: (в потребит. таре)	1 x 10 <sup>5</sup>	0,01	25	1	25
Жидкие кисломолочные продукты, в т.ч. йогурт, со сроками годности не более 72ч		0,01	25	1,0	
Молоко сгущенное с сахаром (в потребит. таре)	2 x 10 <sup>4</sup>	1,0	25		
Молоко коровье сухое цельное	5 x 10 <sup>4</sup>	0,1	25	1,0	
Сыры (твердые, полутвердые, рассольные, мягкие)		0,001	25	не более 500 КОЕ/г	25
Мороженое закаленное	1 x 10 <sup>5</sup>	0,01	25	1,0	25

Отбор проб. Перед вскрытием тары с продукцией крышки фляг, бочек, банок и т. д. очищают от загрязнений, промывают и протирают. В первую очередь проводят отбор проб для микробиологических анализов. Отбор

точечных проб жидких, вязких и сгущенных продуктов проводят кружкой или черпаком вместимостью 0,1; 0,25; 0,5 дм<sup>3</sup> (л) с жесткой ручкой длиной от 50 до 100 см. Отбор точечных проб полутвердых, твердых и сыпучих продуктов проводят шпателями, ножами или специальными щупами. При составлении объединенной пробы молока и молочных продуктов число точечных проб от каждой единицы тары с продукцией, включенной в выборку, должно быть одинаковым. Пробы отбирают в стерильную посуду, закрывают ее корковыми, пластмассовыми или обернутыми фольгой резиновыми пробками или крышками. Допускается отбирать пробы масла, сыра, сухих молочных продуктов в пергамент. Пробы молока и молочных продуктов должны доставляться в лаборатории сразу после их отбора. До начала анализа пробы молока и молочных продуктов следует хранить при температуре от 2 до 8°С. пробы мороженого - при температуре не выше -2°С. Анализ проб продуктов проводят сразу после доставки их в лабораторию, но не позднее, чем через 4 ч после их отбора.

Подготовка проб к исследованию. Подготовка проб к анализу в зависимости от вида молочной продукции проводят согласно ГОСТ 9225-84. Перед посевом готовят десятикратные разведения продукта. Из проб молока, сливок, сметаны, кисломолочных продуктов, мороженого, масла отбирают стерильной пипеткой 10 см<sup>3</sup> и вносят в 90 см<sup>3</sup> стерильных растворов хлористого натрия или фосфатного буфера. Масло и мороженое вносят в растворы, подогретые до 40-45°С. К приготовленным навескам по 10 г творога, творожных изделий; сгущенных молочных консервов и сухих молочных продуктов добавляют 90 см<sup>3</sup> стерильных растворов хлористого натрия или фосфатного буфера, подогретых до 40-45°С и взбалтывают в течение 3-5 мин до возможно более полного эмульгирования. К навеске сыра 10 г постепенно добавляют 90 см<sup>3</sup> стерильных растворов хлористого натрия или лимонно-кислого натрия или фосфатного буфера, подогретых до 40-45°С, и тщательно перемешивают до полного эмульгирования. Получают разведение 1:10. Из первого разведения 1:10 готовят последующие 1:100 и т. д. При посеве на чашки Петри посевной материал вносят от большего разведения к меньшему. В этом случае пользуются одной пипеткой.

Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАМ). Количество засеваемого продукта устанавливают с учетом наиболее вероятного микробного обсеменения в соответствии с табл. 2.

**Таблица 2. Количество продукта, используемого для посева на питательные среды.**

Наименование продукта	Засеваемые объемы или масса, см <sup>3</sup> или г		
Молоко и сливки сырые	0.0001	0.00001	0.000001
Масло	0,01	0,001	0,0001
Молоко и сливки пастеризованные	0,1	0.01	0,001
Молоко или сливки сгущенные с сахаром	0.1	0.01	0,001
Молоко сухое	0,01	0,001	

Мороженое	0,1	0,01	
Плавленный сыр	0,1	0,01	0,001
Лактоза	0,1	0,01	

Из каждой пробы делают посев на две-три чашки из разведений, указанных в табл. Каждое из разведений должно быть засеяно в количестве 1 см<sup>3</sup> в одну чашку Петри с расплавленным и охлажденной до температуры 40-45°C питательным агаром. Допускается посев исследуемого продукта на чашки Петри из одного и того же разведения в количестве 1 и 0,1 см<sup>3</sup>. Сразу после посева содержимое чашки Петри тщательно перемешивают путем легкого вращательного покачивания для равномерного распределения посевного материала. После застывания агара чашки Петри инкубируют при температуре 30°C 72 часа. Количество выросших колоний подсчитывают на каждой чашке.

КМАФАМ в 1 см<sup>3</sup> или 1 г продукта в единицах вычисляют по формуле:

$X = n * 10^m$ , где n - количество колоний, подсчитанных на чашке Петри; m - число десятикратных разведений. За окончательный результат анализа принимают среднеарифметическое, полученное по всем чашкам.

Определение БГКП В среду Кесслера производят посев в количествах, указанных в табл. 3.

**Таблица 3. Количество продукта, необходимого для определения БГКП.**

Наименование продукта	Засеваемые объемы или масса, см <sup>3</sup> или г	Количество пробирок или колбочек со средой, засеваемых из каждого разведения
Молоко и сливки сырые	От 0,1 до 0,00001	1
Масло	1; 0,1; 0,01	1
Молоко и сливки пастеризованные	1; 0,1; 0,01	1
Молоко или сливки сгущенные с сахаром	1 или 0,1	1
Молоко сухое	0,1	1
Мороженое	0,1	1
Сыр зрелый	От 0,1 до 0,001	1

По 1 см<sup>3</sup> соответствующих разведений продукта засевают в пробирки с 5 см<sup>3</sup> среды Кесслер. Пробирки с посевами помещают в термостат при 37°C на 18-24 ч. При исследовании мороженого пробирки с посевом выдерживают в термостате в течение 48 ч. При отсутствии газообразования в наименьшем из засеваемых объемов после инкубации дают заключение об отсутствии в нем БГКП. При наличии газообразования в наименьшем из засеваемых объемов считается, что БГКП обнаружены в нем.

Определение специфической микрофлоры кисломолочных продуктов.

Так как кисломолочные продукты готовят с использованием микробных заквасок, то они должны содержать определенный набор микроорганизмов.

Для определения микрофлоры используют метод микроскопирования. Метод основан на просмотре под микроскопом препаратов, окрашенных метиленовым голубым, для ориентировочной характеристики микрофлоры кисломолочных продуктов. Для приготовления препарата на чистое предметное стекло наносят петлей небольшую каплю исследуемого материала и распределяют на площади около 1 см<sup>2</sup>. При исследовании творога и творожных изделий на стекло наносят каплю воды, вводят в нее петлей продукт, тщательно перемешивают и растирают на площади 1 см<sup>2</sup>. Препарат высушивают, фиксируют на пламени горелки, окрашивают метиленовым голубым и микроскопируют.

### **3. Санитарно-микробиологическое исследование баночных консервов.**

**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 112-120<sup>0</sup>С. Однако, несмотря на воздействие высоких температур, в консервах могут сохраняться жизнеспособные микробные клетки, т.е. не всегда достигается полная стерилизация всех банок.

Споры различных видов спорообразующих микроорганизмов обладают неодинаковой устойчивостью к высоким температурам. Так, споры многих мезофильных аэробных бацилл отмирают уже при 100<sup>0</sup>С, тогда как споры

*Bac.subtilis* могут сохранять жизнеспособность при 130<sup>0</sup>С. 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 110-120<sup>0</sup>С, со сроком хранения от 9 месяцев до 2 лет при температуре не выше 30<sup>0</sup>С.

**группа Д** - полуконсервы (ветчина, бекон, сосиски) стерилизованные при 100-110<sup>0</sup>С. Их безопасность и сохранность гарантируются при хранении при температуре от 2 до 15<sup>0</sup>С.

**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 100<sup>0</sup>С, а в случае асептического консервирования - при 130<sup>0</sup>С. Сохранность таких консервов гарантируется хранением при температуре не выше 5<sup>0</sup>С.

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 30-37<sup>0</sup>С в таре до 1 л включительно, не менее 5 суток, а свыше 1 л - не менее 7 суток. Для термофильных микроорганизмов - термостатируют в любой таре не менее 3 суток. Ежедневно консервы осматривают. При появлении дефектов банки удаляют из термостата, выдерживают при комнатной температуре 24 часа и, если консервы принимают прежний вид, то их считают бездефектными и продолжают термостатирование. По истечении времени инкубирования консервы извлекают из термостата и оставляют при комнатной температуре на сутки. Отмечают дефекты тары видимые невооруженным глазом, признаки развития микроорганизмов в самом продукте в стеклянных банках (брожение, плесневение), в металлической таре - бомбаж.

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

Из каждой консервной банки отбирают одну или несколько навесок, предназначенных для непосредственного посева и приготовления последовательных разведений для проведения всех видов исследования. Навеску для посева отбирают **весовым или объемным методом** после



вскрытия банки консервов в условиях исключают 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 50<sup>0</sup>С МПА, тщательно перемешивают содержимое чашки, охлаждают и ставят в термостат при 37<sup>0</sup>С. Через 72 ч. подсчитывают количество выросших колоний и определяют количество микроорганизмов в 1 см<sup>3</sup> 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 10<sup>4</sup>. Из каждого разведения по 1 мл вносят в чашки Петри, заливают горячим, охлажденным до 50<sup>0</sup>С МПА, термостатируют 24 ч. при 37<sup>0</sup>С, подсчитывают количество колоний. Расчет ведут по формуле:

$$a. 10^n (V_{\text{пр}} + V_{\text{вод}})$$

$$(1) X = \frac{\dots}{V_{\text{пр}} \cdot q}$$

где n – степень разведения продукта при приготовлении разведений;

V<sub>вод</sub> - объем воды, использованный для приготовления пробы;

V<sub>пр</sub> - объем продукта, использованного для приготовления пробы;

q - объем посевного материала, внесенного в чашку Петри.

При анализе сливов с продукта расчет ведут по формуле:

$$A \cdot 10^n \cdot V_{\text{вод}}$$

$$(2) X = \frac{\dots}{V_{\text{пр}} \cdot q}$$

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 посевах 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 37<sup>0</sup>С, 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 37<sup>0</sup>С 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 37<sup>0</sup>С;

- обогащение - посев предварительно обогащенной среды в две жидкие селективные среды (селенитовый бульон, тетраэтионатная среда) с последующим выдерживанием в термостате соответственно при 37 или 42<sup>0</sup>С 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 37<sup>0</sup>С 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 37<sup>0</sup>С 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 42<sup>0</sup>С, а вторую - при 37<sup>0</sup>С. 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 кластридий (СРК) основана на высеве навески (или его разведений) либо культуральной жидкости в железосульфитсодержащие среды и подтверждении принадлежности выросших при 37<sup>0</sup>С 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 45<sup>0</sup>С 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 37<sup>0</sup>С 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 37<sup>0</sup>С 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 внутривнутрибрюшинно 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 4.

**Таблица 4. Микробиологические нормативы мясных консервов**

Группа продуктов	МАФАНМ КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются			
		БГКП	СРК	<i>S.aureus</i>	Патогенные МО, в т.ч. сальмонеллы
Консервы <b>Пастеризованные</b> из говядины и свинины	$2 \times 10^2$	1	0,1	1	25
Консервы <b>стерилизованные</b> из говядины и свинины	Должны удовлетворять требованиям промышленной стерильности для консервов группы А				

#### **4. Санитарно-микробиологическое исследование мяса, колбасных изделий, рыбы и рыбных продуктов.**

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

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

На бактериологическое исследование должно быть направлено мясо, если невозможно определить пригодность его в пищу по результатам органолептического исследования, а также по ряду физико-химических показателей. При наличии обильного микробного обсеменения мяса установленного в результате микроскопии мазков-отпечатков, т.е. при сомнении в отношении пригодности мяса и невозможности определить пригодность его в пищу путем ветеринарно-санитарного осмотра. Чаще на поверхности мясных туш находятся стафилококки и микрококки, молочнокислые бактерии, бактерии группы кишечных палочек, различные виды гнилостных аэробных бацилл и анаэробных клостридий, дрожжи и споры плесневых грибов.

**Отбор проб.** В зависимости от предполагаемого диагноза и характера патолого-анатомических изменений в микробиологический отдел от каждой туши направляют пробы мышц, лимфатических узлов и внутренних органов: Каждую пробу (мяса, колбас, рыбы и т.д.) завертывают отдельно, помещают в общую упаковку, на которой ставят дату отбора образцов, номер туши. Тару с образцами опечатывают или опломбируют. В сопроводительном документе указывают: вид и количество мяса, номера образцов, адрес хозяйства, причину исследования, дату и подпись направившего. Пробы охлажденных продуктов транспортируют при температуре от 0 до 2<sup>0</sup>С. Пробы мяса, предназначенные для микробиологического анализа, исследуют непосредственно после поступления их в лабораторию.

При отборе проб колбасных изделий:

А) 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 5<sup>0</sup>С не более 6 часов.

Б) 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;

Микробиологический контроль мяса, мясопродуктов, колбасных изделий, рыбы и рыбных продуктов проводят для определения количества МАФАНМ, бактерий группы кишечных палочек (БГКП), возбудителей зооантропонозов, обнаружение сальмонелл, палочки протей, токсичных стафилококков и патогенных анаэробов. Кроме того, в колбасных изделиях

определяют количество дрожжей и плесневых грибов, а в рыбе - паразитических вибрионов.

Исследование мяса состоит из следующих этапов:

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

Продолжительность бактериологического исследования мяса 3 суток, при постановке биопробы до 10 суток. Исследуемые туши после взятия проб помещают в холодильник-изолятор при температуре 0-4<sup>0</sup>С. Для микроскопического исследования из каждой пробы готовят препараты-отпечатки для окрашивания по Граму, на наличие капсул - по Ольту или Михину. В каждом препарате изучают не менее 25 полей зрения. Для приготовления препарата-отпечатка стерильными ножницами вырезают из середины каждого образца кусочки размером 1,5х2х2,5 см и прикладывают к предметному стеклу местом свежего среза. Делают по 3 отпечатка на 2-3 предметных стеклах. Мазки высушивают, затем фиксируют. При химическом методе фиксации препараты погружают в метанол на 5 мин или на 15 мин в смесь Никифорова (равные объемы спирта и эфира), окрашивают по Граму и подсчитывают количество микроорганизмов в каждом поле зрения, учитывая отдельно шаровидные и палочковидные (табл.5)

**Таблица 5. Оценка свежести мяса микроскопическим методом**

Степень свежести мяса	pH мяса	Микроскопические показатели
1	2	3
Свежее	5,9-6,5	Единичные кокки или палочки; На стекле нет остатков ткани
Подозрительной свежести	6,6	До 20-30 кокков, единичные палочки. На стекле следы распада мышечной ткани
Несвежее	6,7	Множество палочек, на стекле распавшаяся мышечная ткань

Мясо считается свежим, если в мазках-отпечатках не обнаружена микрофлора или в поле зрения препарата видны единичные (до 10 клеток) кокки и палочковидные бактерии и нет следов распада мышечной ткани. Препарат-отпечаток из мяса сомнительной свежести окрашивается удовлетворительно, видны следы распада мышечной ткани, ядра мышечных

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

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

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

Все кусочки измельчают с соблюдением правил асептики, для посева составляют две пробы по 15 г каждая. Одна проба состоит из кусочков мышц и лимфатических узлов, а вторая - из кусочков паренхиматозных органов (печени, почки и селезенки). Каждую пробу в отдельности помещают в стерильный стакан гомогенизатора, добавляют по 15 мл физиологического раствора и гомогенизируют в электрическом гомогенизаторе не более 2-3 мин (при этом 1 мл приготовленной взвеси содержит 0,5 мл продукта). При отсутствии гомогенизатора взвесь готовят в фарфоровых ступках, растирая пестиком измельченные ножницами образцы в течение 2-3 мин. Полученные взвеси отстаивают 10 мин. Из верхней части надосадочной жидкости готовят ряд последовательных разведений 1:10, 1:100, 1:1000. 1 г мяса и по 1 мл из каждого разведения вносят параллельно в 2 чашки Петри, заливают расплавленным и охлажденным до 50<sup>0</sup>С МПА. Каждую чашку тщательно и осторожно перемешивают, охлаждают, переворачивают вверх дном и инкубируют в термостате 24-48 ч при 30<sup>0</sup>С. Чтобы **определить количество мезофильных бактерий в 1 г мяса**, подсчитывают количество колоний в двух параллельных посевах, определяют среднеарифметическое число и умножают на степень разведения. Для вычисления среднего арифметического нельзя использовать посева, где количество выросших колоний на чашках менее 30. Чашки с первичными посевами на плотных питательных средах просматривают визуально, при необходимости - через лупу. Обращают внимание на колонии характерные для возбудителей сибирской язвы, рожи свиней, пастереллеза, листериоза, кокковых инфекций, а также напоминающих рост микроорганизмов, вызывающих пищевые отравления у людей.

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



**Индикация кишечной палочки.** Для выявления наличия БГКП в определенной навеске мяса, готовят исходное и ряд 10-кратных разведений на физрастворе с таким расчетом, чтобы в посевах на плотных питательных средах получить изолированные колонии. Затем по 1 мл различных разведений вносят в жидкие селективные питательные среды (бульон лактозный с бриллиантовым зеленым и желчью или в среду Кесслера). Посевы выдерживают в термостате при 37<sup>0</sup>, предварительный учет проводят через 24 ч, окончательный – через 48 ч по интенсивному росту микроорганизмов, признаками которого являются помутнение среды, образование газа, изменение цвета индикатора (в результате подкисления рН). Для подтверждения принадлежности микроорганизмов к БГКП проводят высев 0,1 мл культуральной жидкости на одну из дифференциально-диагностических сред (Эндо, Смирнова). Инкубируют в термостате в течение 24 ч. На агаре Эндо они образуют красные колонии с металлическим блеском (и без), на среде Смирнова - желтые колонии с изменением среды в тот же цвет. Для более быстрого получения результатов разрешено проводить первичный посев 0,1 мл исходного или 10-кратного разведения непосредственно на плотные питательные среды, что позволяет сделать заключение о наличии (отсутствии) БГКП в определенной навеске продукта через 24 ч. Для этого отбирают чашки с посевами, на которых выросло от 15 до 150 характерных колоний. Не менее чем из пяти колоний готовят мазки, окрашивают по Граму, изучают морфологические и тинкториальные свойства.

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

При идентификации выделенных культур следует иметь в виду, что эшерихии - грамтрицательные палочки, спор и капсул не образуют, подвижны, не разжижают желатин, не выделяют сероводород и не растут на среде Симмонса, дают положительную реакцию с метиловым красным и отрицательную - Фогеса-Проскауэра.

**Индикация сальмонеллезной палочки.** На основании результатов анализа определяют наличие (отсутствие) сальмонелл и их количество в навеске продукта массой 25 г. Для этого готовят измельченную навеску продукта массой 25 г, вносят ее в колбу с 225 мл среды обогащения (селенитовый бульон, тетратионатная среда) с последующим выдерживанием в термостате соответственно при 37<sup>0</sup>С или 42<sup>0</sup>С в течение 24-48 ч. Следует иметь в виду, что на селенитовом Ф-бульоне *S.typhi suis* и *S.cholerae suis*, как правило, не растут. *S.cholerae suis* растет лучше на среде Киллиана. При появлении роста на средах обогащения, из них делают пересев на плотные селективно-диагностические среды в чашках Петри (агар Эндо, Левина, ВСА) по секторам для получения изолированных колоний. Посевы выдерживают в термостате 24 ч при 37<sup>0</sup>С, исследуют на наличие колоний, по своим характеристикам подозрительных на сальмонеллы.

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

- на Эндо (фуксин сульфитный агар) – круглые, бесцветные колонии;
- на среде Левина – прозрачные, нежно-розовые колонии;
- на среде Смирнова – прозрачные, серовато-фиолетовые колонии;
- среде Плоскирева – бесцветные колонии, но более плотные и меньшего размера, чем на среде Эндо.
- на висмут-сульфитном агаре (ВСА), который применяется для **целенаправленного выделения сальмонелл**, - как правило, черные или коричневые колонии с характерным металлическим блеском. При этом наблюдается прокрашивание в черный цвет участка среды. Исключение составляют некоторые серологические типы из группы С, в частности *S.typhisuis*, растущие на ВСА в виде светло-зеленых колоний.

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

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

**Определение парагемолитических вибрионов в рыбе и морских беспозвоночных.** Метод основан на выявлении типичных колоний на дифференциально-диагностическом агаре (ДДА) определенного состава и установления принадлежности бактерий к парагемолитическим вибрионам по морфологическим и биохимическим свойствам. Для исследования на сальмонеллы, листерии и парагемолитические вибрионы пробы сырья отбирают с частью кишечника и жабер. Из усредненной пробы отбирают навеску в 25 г. Парагемолитические вибрионы, листерии должны отсутствовать в 25 г морских беспозвоночных, подготовленных к реализации в живом виде.

Для выявления присутствия парагемолитических вибрионов пробу в количестве 25 г переносят в 100 мл жидкой среды обогащения. Посевы помещают в термостат при 37<sup>0</sup>С, через 24 ч проводят пересев на поверхность плотного ДДА. Чашки инкубируют при 37<sup>0</sup>С в течение 24 ч, выявляют типичные колонии парагемолитических вибрионов. При подтверждении принадлежности выделенных на ДДА микроорганизмов к парагемолитическим вибрионам проводят изучение морфологических и биохимических свойств.

Парагемолитические вибрионы - мезофильные грамотрицательные палочки, прямые или слегка изогнутые, не образующие спор, активно подвижные. Для идентификации бактерий делают пересев с ДДА в 1%-ную пептонную воду с 3% хлорида натрия, на которой появляется помутнение с образованием нежной голубой пленки. Готовят мазки, окрашивают по Граму, изучают морфологию клеток. Подвижность изучают под фазово-контрастным микроскопом в раздавленной капле или при посеве в

полужидкий МПА (0,25% агара), содержащий 3% хлорида натрия. Засевают суточную бульонную культуру в полужидкий МПА и инкубируют при температуре 37°C в течение 24 ч. Подвижные формы образуют диффузное помутнение, слабоподвижные - вырастают по ходу укола.

В таблице 6 представлены микробиологические показатели мяса и мясопродуктов.

**Таблица 6. Микробиологические показатели мяса и мясопродуктов**

Группа продуктов	МАФАНМ КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются		
		БГКП	СРК	Патогенные МО, в т.ч. сальмонеллы
Мясо свежее (все виды убойных животных) - Парное в отрубях (полутуши, четвертины)	10	0,1	-	25
Охлажденное и переохлажденное в отрубях	1000	0,1	-	25
<b>Мясо замороженное (все виды убойных животных)</b> В отрубях (полутуши) Блоки из жилованного мяса (гов., св., баран.)	1. 10 <sup>4</sup> 5.10 <sup>5</sup>	0,01	-	25
		0,001	-	25
<b>Полуфабрикаты мясные натуральные</b> Фарш говяжий	5.10 <sup>6</sup>	0,001	-	25
<b>Субпродукты убойных животных (охлажденные, замороженные)</b> Печень, почки, язык, мозги, сердце	-	-	-	25

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