

Лекция. Санитарно-микробиологическое исследование проб пищевых продуктов – 13 мая

- 1. Санитарно-микробиологическое исследование проб пищевых продуктов. Цели и задачи.**
- 2. Нормативные документы, регламентирующие методы санитарно-микробиологического исследования пищевых продуктов и критерии оценки их качества по микробиологическим показателям.**
- 3. Методы определения колиформных бактерий, энтерококков, обнаружения патогенных микробов - возбудителей кишечных инфекций.**
- 4. Пути и источники контаминации пищевых продуктов.**

- 1. Санитарно-микробиологическое исследование проб пищевых продуктов. Цели и задачи.**

Пищевые продукты могут содержать разнообразную микрофлору. Естественная и безвредная микрофлора пищевых продуктов представляет собой сложный биоценоз, который служит биологической защитой от нежелательных микроорганизмов. Вместе с тем отдельные виды микроорганизмов могут оказывать влияние на качество пищевых продуктов. При нарушении обработки, хранения или реализации продуктов эти микроорганизмы могут, размножившись до значительного уровня, привести к порче продукта и пищевому отравлению. Микрофлора пищевых продуктов подразделяется на специфическую и неспецифическую. Специфическая микрофлора пищевых продуктов представлена микроорганизмами, которые используются для приготовления продуктов, формирующие продукт или специально добавляемые в него для придания определенных вкусовых и питательных качеств. Они являются обязательным звеном в технологии приготовления продуктов. Специфические микроорганизмы используют в приготовлении всех кисломолочных продуктов, хлеба, пива, вина, в квашении овощей и т.д. Контроль над чистотой этих культур и их сохранением осуществляют микробиологи лабораторий соответствующих предприятий пищевой промышленности. Санитарный микробиолог должен знать специфическую микрофлору для того, чтобы уметь отличить её от неспецифической, загрязняющей продукты. Неспецифическая микрофлора пищевых продуктов - это микроорганизмы, случайно попадающие на пищевые продукты из окружающей среды. Её составляют сапрофиты, патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, а также виды, вызывающие порчу пищевых продуктов. Степень загрязнённости посторонней микрофлорой зависит от многих факторов: правильности заготовки самого пищевого продукта, его транспортировки, хранения, технологии последующей обработки и, на всех этапах, от соблюдения санитарного режима. Особую опасность представляет инфицирование пищевых продуктов патогенными микроорганизмами, многие из которых

способны не только длительно сохранять жизнеспособность в продуктах, но и интенсивно размножаться в них.

Санитарно-микробиологическое исследование пищевых продуктов проводят с целью:

1. Контроля качества сырья, используемого в производстве пищевых продуктов и оценка санитарно-гигиенических условий их изготовления;
2. Контроля режимов хранения пищевых продуктов и оценки санитарно-гигиенических условий их транспортировки и реализации;
3. Контроля над обеспечением эпидемической безопасности пищевых продуктов.

Гигиенический контроль пищевых продуктов предусматривает их оценку по следующим показателям:

1. величине общей микробной обсемененности (мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (МАФАМ));
2. наличие санитарно-показательных микроорганизмов: БГКП, энтерококков;
3. присутствию условно-патогенных бактерий (кишечной палочки, золотистого стафилококка, *Bacillus cereus*, бактерий рода *Proteus*, клостридий, *Vibrio parahaemolyticus*);
4. наличие патогенных микроорганизмов (сальмонелл, *Listeria monocytogenes*, бактерий рода *Yersinia* и др.);
5. присутствию специфических возбудителей микробной порчи продукта (дрожжи, плесневые грибы, молочнокислые микроорганизмы);
6. количеству микроорганизмов заквасочной микрофлоры и пробиотических микроорганизмов (молочнокислые, пропионовокислые микроорганизмы, дрожжи, бифидобактерии, ацидофильные бактерии и др.) - для продуктов с нормируемым уровнем биотехнологической микрофлоры и в пробиотических продуктах.

Принципиальная схема микробиологического исследования пищевых продуктов:

1. Проба.
2. Гомогенизация.
3. Оптимизация pH.
4. Суспензирование.
5. Посев на питательные среды.

2. Нормативные документы, регламентирующие методы санитарно-микробиологического исследования пищевых продуктов и критерии оценки их качества по микробиологическим показателям.

Законодательная база обеспечения микробиологической безопасности пищевых продуктов, производимых и реализуемых в Российской Федерации и странах Таможенного союза, нашла свое отражение в следующих документах:

1. Федеральном законе от 27.12.02 № 184–ФЗ «О техническом регулировании»;
2. Федеральном законе от 22.01.2000 № 29–ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов»; Федеральном законе от 09.11.1996 № 2–ФЗ «О защите прав потребителя»;
3. Федеральном законе от 30.03.1999 № 52–ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения»;
4. Положении о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании № 554 от 24 июля 2000 г.;
5. Федеральном законе Российской Федерации от 12.06.2008 № 88–ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию»;
6. Техническом регламенте таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции».
7. СанПиН 2.3.2.1078-01.
8. ГОСТ Р 54004-2010 «Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний».

В пищевых продуктах не допускается наличие патогенных микроорганизмов и возбудителей паразитарных заболеваний, их токсинов, вызывающих инфекционные и паразитарные болезни или представляющих опасность для здоровья человека и животных. Для различных групп пищевого сырья и продуктов питания действуют соответствующие стандарты (ГОСТы) и критерии санитарного благополучия, а в случае их отсутствия придерживаются гигиенических требований к качеству. Обычно при этом нормируется масса (вес) продукта, в котором не допускается присутствие БГКП, условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, а также указывается допустимое микробное число продукта, в КОЕ/г(мл). Основными показателями качества продуктов являются ОМЧ и наличие патогенных микроорганизмов. Обнаружение последних ввиду трудоемкости проводят лишь при первичной обработке мяса и анализе мясных продуктов, молока (не всегда), а также при контроле консервного производства.

Отбор проб для исследования проводят в соответствии с ГОСТ Р 54004-2010 «Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний» с учетом требований нормативно-технической документации на конкретный вид продукта.

3. Методы определения колиформных бактерий, энтерококков, обнаружения патогенных микробов - возбудителей кишечных инфекций.

Объем выборки (количество выборочных единиц) для определения микробиологических показателей безопасности зависит: от степени

опасности выявляемых микроорганизмов (при выявлении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов количество отбираемых проб увеличивается); от восприимчивости к инфекции потребителя, для которого предназначен пищевой продукт (для продуктов детского и диетического питания количество отбираемых проб увеличивается). Перед отбором проб визуально оценивают внешний вид упаковки и (или) продукта.

Лабораторные пробы продуктов для микробиологических испытаний отбирают до отбора проб для физико-химических и органолептических испытаний.

Отбор проб.

Пробы продуктов для микробиологических испытаний отбирают в стерильную посуду, горло которой предварительно обжигают в пламени горелки, или в стерильную пластиковую посуду, в стерильные полиэтиленовые пакеты, в стерильную фольгу. Пробы отбирают с помощью стерильных инструментов. Масса (объем) лабораторной пробы продукта устанавливается в соответствии с нормативно-технической документацией на конкретный вид продукции и должна быть достаточной для проведения микробиологических испытаний. Лабораторные пробы формируют из отбираемых мгновенных проб.

Отбор проб от кусковой продукции. От кусковой продукции массой нетто не более 1000 г отбирают суммарные пробы путем взятия мгновенных проб из разных мест и с различной глубины, а также с поверхностных слоев, соприкасающихся с тарой, в одну посуду или каждую пробу, отобранную из разных мест, в отдельную посуду в зависимости от цели испытания. Пробы отбирают ложкой, половником, пинцетом или другим инструментом, в зависимости от вида и размера кусков продукта. От кусковой продукции массой 1000 г и более пробы отбирают одним из следующих методов: отрезают или вырезают часть продукта ножом, пилой или другим инструментом. У изделий квадратной формы разрез делают перпендикулярно к грани, у изделий продольной формы - перпендикулярно продольной оси, у шарообразных изделий – клинообразно. Продукт в нескольких местах режут ножом, отбирают скальпелем продукт с поверхности разреза и из глубины; срезают поверхностный слой продукта толщиной от 0,5 до 1 см ножом или проволокой, отбирают продукт, находящийся под срезанным слоем, при помощи скальпеля или пробоотборника (буравчика или зонда). При отборе пробы из глубины продукта специальным пробоотборником просверливают продукт в разных местах не менее чем до половины высоты куска. Часть продукта, попавшая в пробоотборник, является мгновенной пробой; от твердого или хрупкого продукта пробы отбирают при помощи долота или другого инструмента. Отбор мгновенных проб повторяют до тех пор, пока не отберут массу (объем) продукта, необходимую для формирования лабораторной пробы, при этом массу (объем) мгновенных проб допускается не устанавливать.

Отбор проб от жидкой или пастообразной продукции. Из емкости вместимостью не более 1000 см³ пробу отбирают пипеткой или

металлическим половником. Если продукт неоднороден по высоте емкости, то содержимое ее перед отбором пробы тщательно перемешивают. Из емкости вместимостью 1000 см³ и более пробу отбирают с различной глубины не менее чем из трех слоев продукта в одну посуду или каждую пробу в отдельную посуду, в зависимости от цели испытания. При отборе проб из резервуара, оснащенного краном, кран сначала промывают, вытирают ватой, пропитанной этиловым спиртом, и обжигают в пламени. Предварительно выпускают от 0,1 до 1 дм³ жидкости (в зависимости от вместимости резервуара и размера диаметра крана) и только после этого отбирают пробы в посуду таким образом, чтобы жидкий (пастообразный) продукт попадал непосредственно в посуду.

Отбор проб от сыпучих продуктов. Пробу от сыпучего продукта отбирают после его тщательного перемешивания мешалкой или половником. Пробу от продукта, который не может быть перемешан, отбирают путем взятия мгновенных проб из разных мест и с различной глубины, а также с поверхностных слоев, соприкасающихся с тарой, в одну посуду или каждую пробу, отобранную из разных мест, в отдельную посуду в зависимости от цели испытания.

Отбор проб от продукции смешанной консистенции. Пробы отбирают таким образом, чтобы в них входили все компоненты в соотношении, в котором они находятся в продукте. Допускается в зависимости от особенностей анализируемого продукта, цели испытания и предполагаемой микробиальной загрязненности отбирать пробы от каждого компонента отдельно.

Транспортирование и хранение. Каждую отобранную лабораторную пробу маркируют этикетками с указанием наименования продукта, предприятия-изготовителя, номера партии, даты отбора проб (с указанием часа отбора проб), цели микробиологического испытания. Пробы замороженных продуктов упаковывают определенным способом, обеспечивающим сохранение проб в замороженном состоянии при температуре, не превышающей -15°C (термос, изотермическая коробка, обкладка сухим льдом). Пробы скоропортящихся продуктов транспортируют при температуре +5°C не более 6 ч. Пробы консервов и продуктов транспортируют в соответствии с условиями транспортирования продукции, установленными в нормативно-технической документации на конкретный вид продукции.

Методика исследования. Перед проведением исследования пробы гомогенизируют и готовят их серийные разведения (1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 и т. д.). Для получения гомогенных суспензий исследуемого материала иногда используют изотонический раствор хлорида натрия с добавлением твина-80 или 0,1%-ю пептонную воду. **Определение общей микробной обсемененности.** ОМЧ определяют у тех продуктов и блюд, которые не должны содержать специфических микроорганизмов. Методики исследования жидких и плотных продуктов такие же, как для воды и почвы соответственно, но посеvy инкубируют при 30°C в течение 72 ч.

Определение БГКП проводят бродильным методом, основанным на накоплении бактерий после посева установленного объема пробы в жидкую питательную среду, с последующим пересевом на дифференциально-диагностическую среду и идентификации колоний по культуральным и биохимическим тестам. Посев ведется в 2-3, а в некоторых случаях - в 5-ти повторностях. Объемы воды выбирают с таким расчетом, чтобы в одном из разбавлений получить хотя бы один отрицательный результат. При исследовании на этапах очистки и обеззараживания засевают 100; 10; 1 и 0,1 см³ воды. Посев пробы производится в глюкозопептонную среду (1% пептонная вода, 0,5% раствор глюкозы, 0,5% раствор хлорида натрия, индикатор Андрее, поплавков). Для посевов больших объемов используют концентрированную среду, содержащую 10-кратные количества указанных веществ. Так, посев 100 мл воды производят в 10 мл концентрированной среды, 50 мл - в 15 мл концентрированной среды, 10 мл - в 1 мл концентрированной среды; 1 мл и последующие разведения - в 10 мл глюкозопептонной среды нормальной концентрации. Большие объемы воды засеваются во флаконы или колбы, меньшие - в пробирки. Посевы инкубируют в термостате в течение суток при температуре 37°C. Из пробирок с посевами, в которых наблюдается помутнение (а также образование кислоты и газа в поплавке), делают высев петлей штрихами на поверхность среды Эндо, разделенной на 3-4 сектора. Посевы выдерживают в термостате при температуре 37°C в течение 16-18 ч. При наличии на среде Эндо характерных для БГКП колоний (красных с металлическим блеском) следует провести тесты, перечисленные выше. Положительный ответ на наличие БГКП дается в том случае, если наблюдается рост характерных колоний, образованных оксидазоотрицательными, грамотрицательными бактериями, сбраживающих глюкозу при 37°C с образованием кислоты и газа. Таким образом, положительный ответ выдается через 40—42 ч. Результат выражается в виде индекса (титра) БГКП, цифровое выражение которого определяют по соответствующим таблицам. **Определение *Staphylococcus aureus***. Определенное количество исследуемого материала засевают в солевой бульон для накопления стафилококков, инкубируют при 37°C в течение 24 ч. При помутнении среды делают высевы на желточно-солевой агар для получения изолированных колоний, которые затем идентифицируют по морфологическим, культуральным, биохимическим свойствам, наличию плазмокоагулазы. Определение других условно-патогенных и патогенных микроорганизмов проводят с использованием соответствующих накопительных и дифференциально-диагностических сред.

4. Пути и источники контаминации пищевых продуктов.

Пищевые продукты являются благоприятной средой для сохранения и размножения многих патогенных микроорганизмов благодаря наличию различных ростовых факторов, витаминов и др. Пищевые продукты обычно невозможно полностью освободить от присутствия микроорганизмов без

риска изменения их вкусовых качеств. Пищевые продукты при нарушении санитарно-гигиенических режимов их производства, хранения и реализации могут послужить источником инфекционных болезней людей. Для возникновения заболевания достаточно содержания в пище небольшого числа живых клеток патогена, которые благодаря высокой патогенности для человека активно размножаются в его организме и вызывают специфическое заболевание.

Через пищевые продукты могут передаваться возбудители многих инфекционных болезней - брюшного тифа и паратифов, сальмонеллёзов, дизентерии, эшерихиозов, ботулизма, холеры, бруцеллёза, сибирской язвы и вирусных инфекций (ящур, полиомиелит и др.). Пищевые токсикоинфекции, вызываемые условно-патогенными микроорганизмами, возникают после употребления в пищу зараженных пищевых продуктов. Обсеменение их микробами может происходить на всех этапах заготовки, хранения и приготовления. Источником заражения пищевых продуктов возбудителями пищевых инфекций могут быть люди и животные (больные и бациллоносители). На пищевых продуктах возбудители пищевых инфекций могут длительно сохраняться жизнеспособными и вирулентными. Многие из них устойчивы к низким температурам и выживают даже в замороженных продуктах. Пищевые инфекции протекают, как типичные заразные болезни, с характерными для каждой клиническими признаками.

Кишечные инфекции. Это брюшной тиф, паратифы А и В, дизентерия, холера. Источником инфекций является человек. Возбудители кишечных инфекций (за исключением холеры) входят в состав кишечнотифозной группы бактерий, включающей и нормальных обитателей кишечника человека и животных - кишечную палочку *Escherichia coli* и ее разновидности. Бактерии кишечнотифозной группы. Имеют много общих признаков. Все они относятся к семейству *Enterobacteriaceae*. Многочисленные представители этой группы различаются по степени патогенности для человека. Возбудители, пути заражения, клинические особенности и профилактика брюшного тифа и паратифов различаются незначительно. Бактерии брюшного тифа и паратифов относят к роду *Salmonella*. При нагревании до 60-65 °С такие бактерии погибают в течение 30-45 мин, при кипячении - за несколько секунд. Во внешней среде эти бактерии могут сохраняться длительное время. Так, палочка брюшного тифа остается жизнеспособной на мякише пшеничного хлеба 25-30 дней, на сливочном масле, сыре, сале - несколько месяцев, на овощах и фруктах - 10-15 дней, на мясе (на холоде) - 20-40 дней. Вызывают поражение (воспалением, изъязвлением) тонкого кишечника. Многие лица после выздоровления продолжительное время остаются бациллоносителями.

Бактериальная дизентерия вызывается рядом биологически близких между собой бактерий, объединенных в род Шигелла (*Shigella*). Наиболее распространенными возбудителями являются палочка Зонне и палочка Флекснера. При 45 °С они не растут, при нагревании до 60 °С погибают через 10-20 мин. В пищевых продуктах и на посуде сохраняются до 10-20 дней.

Дизентерийные микробы локализуются в толстом кишечнике больного, вызывая язвенное воспаление его слизистой оболочки: Инкубационный период продолжается от 2 до 7 дней. Выздоровевшие люди длительное время являются бациллоносителями. Некоторые дизентерийные бактерии (типа Зонне) и вызывающие паратиф В способны размножаться на пищевых продуктах, преимущественно прошедших тепловую обработку. При употреблении в пищу продуктов, содержащих большое количество таких бактерий, заболевание протекает нетипично для дизентерии и паратифа, а как острое желудочно-кишечное заболевание, сходное с пищевыми отравлениями типа токсикоинфекции.

Возбудителем холеры является вибрион (*Vibrio cholerae*). При 55 °С он погибает через 25–30 мин, при 80 °С - через 5 мин. На пищевых продуктах сохраняется до 10-15 дней, в почве - до 2 мес, в воде - несколько суток. Вибрион устойчив к низким температурам, но чувствителен к кислотности среды. Холерный вибрион образует сильнодействующие эндотоксин и экзотоксин – энтеротоксин (кишечный яд). Степень тяжести заболевания различна; бывают тяжелейшие скоротечные формы, заканчивающиеся летально.

В предупреждении кишечных инфекций особое значение имеют соблюдение санитарно-гигиенических правил и личной гигиены работников на пищевых предприятиях, предприятиях общественного питания и торговли; предохранение продуктов от контакта с бациллоносителями; борьба с мухами.

К пищевым инфекциям, передающимся человеку от больного животного (или бациллоносителя), относят бруцеллез, ящур, сибирскую язву, туберкулез. Возбудители бруцеллеза - бруцеллы. Они могут длительно сохраняться в пищевых продуктах: в сале, масле – до 60–80 дней, в брынзе – до 45, в мороженом мясе – до 60 дней. Бруцеллы устойчивы к высушиванию, легко переносят холод, но быстро гибнут под действием высоких температур: при нагревании до 60–65 °С они погибают через 20–30 мин, до 80–90 °С – через 5 мин, при кипячении – через несколько секунд. Бруцеллезом болеют различные животные – крупный и мелкий рогатый скот, свинья и др. Одним из характерных признаков этого заболевания у рогатого скота является преждевременный отел.

Для человека наиболее опасен возбудитель бруцеллеза овец и коз (*Brucella melitensis*). Заболевание в большинстве случаев связано с употреблением молока и молочных продуктов. Заражение происходит и при контакте с больными животными или зараженными продуктами животного происхождения. Бруцеллез у человека имеет много клинических симптомов, общих с другими заболеваниями (ревматизмом, малярией и др.), и нередко принимает хроническую форму. Профилактические мероприятия против бруцеллеза направлены на оздоровление животноводческих хозяйств. В зараженных районах исключается потребление молока в сыром виде. Перед реализацией молоко подвергают пастеризации при повышенной температуре (65–70 °С в течение 30 мин). Мясо, поступившее из зараженных хозяйств,

обезвреживается путем длительного проваривания небольшими кусками либо направляется в переработку в колбасное или консервное производство.

Возбудителем ящура является вирус. Он нестоек к нагреванию, при 60–70°C гибнет через 5–15 мин, при 100°C – моментально. Вирус очень устойчив к низким температурам, может длительно сохраняться в пищевых продуктах, например в масле – до 25 дней, в мороженом мясе – до 145 дней. Ящуром болеют крупный и мелкий рогатый скот и другие животные. Человек может заразиться при контакте с больным животным, при употреблении сырого молока. Проявляется заболевание в воспалении с изъязвлением слизистой ротовой полости. Мясо, полученное от больных и подозрительных на заболевание ящуром животных, используют для переработки на колбасы и консервы или оно должно подвергаться длительной тепловой обработке (провариванию).

Сибирская язва – острое инфекционное заболевание животных, передающееся человеку. Возбудитель сибирской язвы – *Bacillus anthracis*. Споры отличаются большой устойчивостью, они длительно выдерживают кипячение и даже автоклавирование при 130 °C в течение 5–10 мин; годами сохраняются в почве, на шкурах, волосе и т. п. Вегетативные клетки при 75 °C гибнут через 2–3 мин. Заражение человека может происходить в результате прямого контакта с больными животными или через инфицированное сырье и изделия из него (меховые воротники, шапки, рукавицы и др.). Сибирская язва у человека может проявиться в трех формах: кишечной, легочной и кожной. В настоящее время в РФ благодаря систематическим профилактическим мероприятиям крайне редко регистрируется только кожная форма.

Возбудителем туберкулеза является открытая в 1882 г. Р. Кохом бактерия из актиномицетов – *Mycobacterium tuberculosis*. По сравнению со многими другими бесспорными бактериями эти бактерии более устойчивы к физическим и химическим факторам среды. В пищевых продуктах сохраняются длительно, например в сыре – до 2 мес, в кисломолочных продуктах – до 20 дней, в масле – до 3 мес, в замороженном мясе – до года. В жидкой среде они погибают при нагревании до 100 °C в течение 10 с, при 70 °C – через несколько минут, при 60 °C – через 20 мин. Туберкулезом болеют многие животные. Туберкулез у человека вызывают два вида микобактерий: человеческий (заражение чаще через дыхательные пути) и бычий (заражение через молоко и молочные продукты). Заражение человека возможно и птичьим видом микобактерий туберкулеза при употреблении в пищу недостаточно проваренного мяса больных кур или куриных яиц. Куриные яйца из зараженных хозяйств используют только в кондитерском производстве при изготовлении изделий, подвергающихся высокотемпературной обработке.