

Микробиологический контроль качества пищевой продукции

А.П.Шепелин, И.А.Дятлов, О.В.Полосенко

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»,
Оболенск, Российская Федерация

Комплексное санитарно-микробиологическое исследование пищевых продуктов включает своеобразие используемых методов для выявления степени их недоброкачественности. Микробиологические нормативы безопасности пищевых продуктов регламентированы техническими регламентами Таможенного союза и другими рекомендательными документами. Широко используемым методом оценки микробной обсемененности и выявления патогенов является высеивание на различные питательные среды для получения сравнимых, достаточно полных и гарантирующих исключение грубых ошибок интерпретации результатов исследований. Для обеспечения бактериологических лабораторий предприятий пищевой отрасли широкой номенклатурой питательных сред отечественные производители выпускают зарегистрированные в РФ питательные среды, гарантирующие их качество и стабильность.

Ключевые слова: качество, пищевая продукция, микробиологический контроль

Для цитирования: Шепелин А.П., Дятлов И.А., Полосенко О.В. Микробиологический контроль качества пищевой продукции. Бактериология. 2017; 2(2): 39–47. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-39-47

Microbiological control of food products quality

A.P.Shepelin, I.A.Dyatlov, O.V.Polosenko

State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Complex sanitary and microbiological research of food products includes the peculiarity of the methods used to determine the degree of their inferiority. Microbiological standards for food safety are regulated by the technical regulations of the Customs Union and other recommendatory documents. A widely used method for assessing microbial contamination and detecting pathogens is to seed on various nutrient media to obtain comparable, sufficiently complete and guaranteeing the elimination of gross errors in interpreting the results of the studies. To ensure the bacteriological laboratories of enterprises of the food industry with a wide range of nutrient media, domestic producers produce nutrient media registered in the Russian Federation that guarantee quality and their stability.

Keywords: quality, food products, microbiological control

For citation: Shepelin A.P., Dyatlov I.A., Polosenko O.V. Microbiological control of food products quality. Bacteriology. 2017; 2(2): 39–47. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-39-47

Постановлением Правительства Российской Федерации №1364-р от 29.06.2016 г. утверждена «Стратегия повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года», которая ориентирована на обеспечение полноценного питания, профилактику заболеваний, увеличение продолжительности и повышение качества жизни населения, стимулирование развития производства и обращения на рынке пищевой продукции надлежащего качества. Она является основой для формирования национальной системы управления качеством пищевой продукции.

Совершенствование действующих и (или) создание новых методов анализа основных физико-химических, микробиологических

показателей и органолептических свойств для различных видов пищевой продукции является одним из ключевых пунктов в направлении реализации задач в области повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации [1].

Обеспечение микробиологической безопасности пищевых продуктов является одной из главных задач, решение которой непосредственно направлено на охрану здоровья населения. Во всем мире эта проблема приобретает особую актуальность в связи с увеличением числа заболеваний, передающихся через пищевые продукты, в особенности кишечных инфекций и бактериальных отравлений.

Для корреспонденции:

Шепелин Анатолий Прокопьевич, доктор биологических наук, заместитель директора по научно-производственной работе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

Адрес: Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-0020

E-mail: shepelin@obolensk.org

Статья поступила 10.05.2017 г., принята к печати 30.06.2017 г.

For correspondence:

Anatoly P. Shepelin, Sc.D. (Bio.), Deputy Director for science and production, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0020

E-mail: shepelin@obolensk.org

The article was received 10.05.2017, accepted for publication 30.06.2017

Нормы и правила по гигиене пищевых продуктов были приняты комиссией Кодекс Алиментариус и переданы всем государствам – членам ФАО и ВОЗ в качестве рекомендательного документа, внедрение которого остается на усмотрение государств. Комиссия выразила мнение, что Нормы и правила могут предоставить полезный список требований для государственных учреждений, занимающихся контролем качества пищевых продуктов.

В настоящее время вся пищевая цепь, начиная от первичного производства и заканчивая конечным потреблением, определяет необходимые условия гигиены для производства безопасных и пригодных к потреблению пищевых продуктов [2].

Гигиенические нормативы по микробиологическим показателям безопасности пищевых продуктов включают следующие группы микроорганизмов:

- санитарно-показательные, к которым относятся: мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (МАФАНМ), бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформы), бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, энтерококки;
- условно-патогенные микроорганизмы, к которым относятся: *E. coli*, *S. aureus*, бактерии рода *Proteus*, *B. cereus* и сульфитредуцирующие кластридии, *Vibrio parahaemolyticus*;
- патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы и *Listeria monocytogenes*;
- бактерии рода *Yersinia* и другие патогенные микроорганизмы в соответствии с эпидситуацией в регионе производства;
- микроорганизмы порчи – дрожжи и плесневые грибы, молочнокислые микроорганизмы;
- микроорганизмы заквасочной микрофлоры и пробиотические микроорганизмы (молочнокислые микроорганизмы, пропионовокислые микроорганизмы, дрожжи, бифидобактерии, лактобациллы и др.) в продуктах с нормируемым уровнем технологической микрофлоры и в пробиотических продуктах.

Критериями безопасности консервированных пищевых продуктов (промышленная стерильность) является отсутствие в консервированном продукте микроорганизмов, способных развиваться при температуре хранения, установленной для конкретного вида консервов, и микроорганизмов и микробных токсинов, опасных для здоровья человека [3].

В Российской Федерации и странах Таможенного союза микробиологические показатели пищевых продуктов не должны превышать нормативов, установленных техническими регламентами Таможенного союза (ТР ТС) «О безопасности пищевой продукции» и другими техническими регламентами Таможенного союза, действие которых распространяется на пищевые продукты [4–8].

Микробиологические исследования пищевых продуктов проводят в соответствии с ТР ТС, ГОСТами, СанПиНами, методическими указаниями и другими нормативными документами.

Пристальное внимание исследователей к данной проблеме привлекает тенденция к расширению спектра пищевых инфекций и появлению новых возбудителей.

Обширная группа условно-патогенных и патогенных бактерий включает значительное количество микроорганизмов, которые могут рассматриваться как эмерджентные пищевые патогены (от английского emergent), что означает «внезапно появляющиеся», «вновь возникающие» инфекции.

Наиболее значимыми в эпидемиологическом отношении в настоящее время являются возбудители новых или так называемых «эмерджентных» бактериальных инфекций (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, энтерогеморрагические *E.coli* (EHEC), *Campylobacter jejuni*, *Enterobacter sakazakii* и др.). Термины «эмерджентные пищевые патогены» и «эмерджентные пищевые инфекции» в последнее время широко используются в научных публикациях и официальных документах международного сообщества и ВОЗ [9].

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

Показатель КМАФАнМ характеризует качество, свежесть и безопасность продуктов питания, а также позволяет оценивать уровень санитарно-гигиенических режимов на производстве, условий хранения и транспортировки продукта.

Данный показатель применяется повсеместно для оценки качества продуктов, за исключением тех, в производстве которых используются специальные микробные культуры (например, пиво, квас, кисломолочные продукты и т.п.). В составе КМАФАнМ представлены различные таксономические группы микроорганизмов – бактерии, дрожжи, плесневые грибы. Их общая численность свидетельствует о санитарно-гигиеническом состоянии продукта, степени его обсемененности микрофлорой.

Продукты, содержащие большое количество бактерий, даже непатогенных и не изменяющих их органолептические показатели, нельзя считать полноценными. Значительное содержание жизнеспособных бактериальных клеток в пищевых продуктах (за исключением тех, при производстве которых применяют закваски) свидетельствует либо о недостаточно эффективной термической обработке сырья, либо о плохой мойке оборудования, либо о неудовлетворительных условиях хранения продукта. Повышенная бактериальная обсемененность продукта свидетельствует также о его возможной порче.

Микробиологические нормативы безопасности в ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» [4] предусматривают допустимые уровни показателя КМАФАнМ различных видов пищевых продуктов, например, в парном мясе показатель КМАФАнМ КОЕ/г (см³) должен быть не более 10, в рыбной продукции горячего и холодного копчения – не более 1×10^4 , в хлебобулочных изделиях – не более 1×10^3 и т.д.

КМАФАнМ – это число бактерий, способных образовывать колонии на поверхности и/или в питательном агаре при температуре 20–37°C в течение 24–48 ч, видимые с увеличением в 2 раза [10].

Определение КМАФАнМ в 1 г (1 см³) продукта (общее микробное число – ОМЧ) [10–12] предполагает использование метода посева в агаризованные питательные среды. Метод предназначен для пищевых продуктов, содержащих в 1 г твердого продукта более 150 или в 1 см³ жидкого продукта более 15 КОЕ мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФАнМ). Для этого используют чашечный агаровый глубинный метод, когда 1 см³ продукта в разведении вносят в чашку Петри и заливают расплавленным и остуженным до (45 ± 1°) С питательным агаром (рис. 1, 2). Если ожидают ползучий рост микроорга-



Рис. 1. Рост тест-штамма *Bacillus cereus* NCTC 8035 (ATCC 10702). Посев глубинным методом на среду КМАФАнМ производства ФБУН ГНЦ ПМБ.

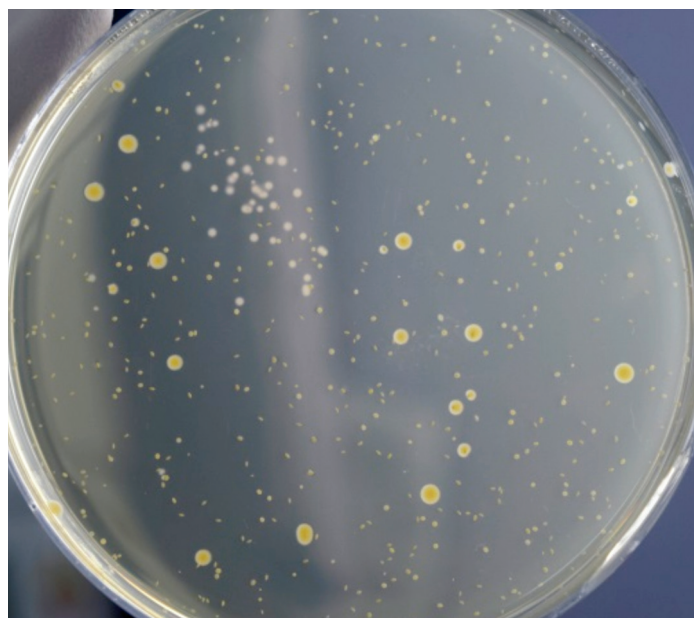


Рис. 2. Рост тест-штамма *S. aureus* ATCC 6538-P. Посев глубинным методом на среду КМАФАнМ производства ФБУН ГНЦ ПМБ.

низмов *Bacillus* или *Proteus*, то посеvy после застывания среды заливают вторым слоем питательной среды или голодного агара. После застывания чашки переворачивают и помещают в термостат для инкубации [13].

Питательные среды производства ФБУН ГНЦ ПМБ широко используются бактериологическими лабораториями не только в клинической, но и санитарной микробиологии. Многолетний опыт производства питательных сред в ФБУН ГНЦ ПМБ позволяет разрабатывать и сертифицировать новые питательные среды с целью внедрения их в практику производства, а следовательно, расширения номенклатуры сухих питательных сред для контроля пищевых продуктов.

Питательная среда производства ФБУН ГНЦ ПМБ для определения КМАФАнМ широко используется бактериологическими лабораториями в санитарной микробиологии. Она обеспечивает при посеве по 0,1 мл микробной взвеси через (21 ± 3) ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ на всех засеянных чашках Петри рост тест-штамма *B. cereus* NCTC 8035 (ATCC 10702) из разведения 10^{-5} , а также рост тест-штаммов *S. aureus* ATCC 6538-P и *E. cloacae* ГИСК А-186 из разведения 10^{-6} .

2. Определение количества бактерий группы кишечных палочек

Для приведения в соответствие показателя «бактерии группы кишечных палочек» (БГКП) с принятой международной номенклатурой (Coliformes – FAO/ВОЗ и СЭВ) к бактериям группы кишечных палочек отнесены грамтрицательные, не образующие спор палочки, сбраживающие лактозу с образованием кислоты и газа при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$. При необходимости производится дальнейшее исследование с идентификацией до *E. coli*. В тех случаях, когда на продукт имеется норматив – отсутствие БГКП в определенной массе продукта (альтернативный показатель), то результат записывается в соответствии с количеством продукта, подвергнутого микробиологическому анализу. Например, «бактерии груп-

пы кишечных палочек в 1 г – отсутствуют». В тех случаях, когда продукт должен содержать сравнительно низкие количества БГКП – не выше 10 (например, диетические молочные продукты – творог, сметана детская диетическая и т.д.), определение БГКП проводят методом наиболее вероятного числа (НВЧ). В тех случаях, когда на продукт имеется действующий ГОСТ, предусматривающий норматив по коли-титру, или необходимо выявить значительную степень загрязнения продукта БГКП, определяют их коли-титр [14].

В Российской Федерации и странах Таможенного союза содержание БГКП также ограничено ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» [4], ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции» [7] и другими техническими регламентами.

Так, например, бактерии группы кишечных палочек (колиформы), не допускаются в 1,0 г парного мяса (всех видов животных) и колбасных изделий; в 0,1 г макаронных изделий быстрого приготовления; в 0,01 г круп, не требующих варки, и т.д.

Для обнаружения и определения количества presumptивных бактерий *E. coli* и последующего расчета НВЧ используется ЕС-бульон, в котором посеvy инкубируются при температуре 44°C .

Presumptивная *E. coli* (presumptive *E. coli*) – бактерия, ферментирующая при температуре 44°C лактозу с образованием газа и образующая индол из триптофана. Если в ЕС-бульоне обнаружилось газообразование и, параллельно, образование индола в пептонной воде при температуре 44°C , результат расценивается как «содержащие presumptивную *E. coli*» в граммах или см³.

Питательная среда для селективного определения колиформных бактерий и *E. coli* (ЕС-бульон) предназначена для санитарно-бактериологических исследований воды, пищевых продуктов и других материалов с целью селективного определения колиформных бактерий при температуре инкубирования $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, а также *E. coli* и термотолерантных колиформных бактерий при температуре инкубирования $(44 \pm 0,5)^\circ\text{C}$.

Согласно соответствующим документам [15, 16], исследуемый материал после культивирования в жидкой селективной обогатительной среде при обнаружении затемнения, образования хлопьев или вспенивания среды высевают в ЕС-бульон. После инкубирования при различных температурах культивирования (37 ± 1)°C и ($44 \pm 0,5$)°C проводят визуальный учет результатов, учитывая наличие роста по диффузному помутнению среды и газообразованию.

ЕС-бульон производства ФБУН ГНЦ ПМБ обеспечивает во всех засеянных пробирках при посеве в 9 мл среды по 1,0 мл микробной взвеси из разведения 10^{-7} через 24–48 ч инкубации при температуре (37 ± 1)°C визуально обнаруживаемый рост в виде диффузного помутнения и газообразования каждого из тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* 675, *K. pneumoniae* 418 и рост в виде диффузного помутнения и газообразования через 24–48 ч инкубации при температуре ($44 \pm 0,5$)°C каждого из тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* 675.

ЕС-бульон полностью подавляет во всех засеянных пробирках рост тест-штамма *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 (NCTC 775) и *Bacillus cereus* NCTC 8035 при посеве в 9,0 мл среды по 1,0 мл микробной взвеси из разведения 10^{-4} через 24–48 ч инкубации при температуре (37 ± 1)°C.

Совокупность компонентов, входящих в состав ЕС-бульона, обеспечивает питательные потребности для накопления колIFORMных бактерий и *E. coli*. Соли желчных кислот подавляют рост грамположительных микроорганизмов. Фосфатный буфер поддерживает требуемый pH питательной среды.

3. Выявление бактерий рода *Salmonella*

Нормирование микробиологических показателей безопасности пищевых продуктов осуществляется для большинства групп микроорганизмов по альтернативному принципу, т.е. нормируется масса продукта, в которой не допускается патогенных микроорганизмов, в т.ч. сальмонелл. По требованиям различных нормативных документов, в том числе и СанПиН 2.3.2.1078-01 [17], сальмонеллы не допускаются в 25 г колбасных изделий, готовых мясных и других изделий из мяса. Сухие молочные смеси моментального приготовления имеют более жесткие требования по микробиологическим показателям в отношении сальмонелл. Масса, в которой не допускаются патогенные микроорганизмы, в т.ч. сальмонеллы – 100 г [3].

Бактерии рода *Salmonella* могут присутствовать в продукте в небольшом количестве вместе с большим количеством других бактерий из семейства *Enterobacteriaceae* или других семейств. Поэтому предварительное обогащение необходимо для выявления небольшого числа бактерий рода *Salmonella* или сублетально поврежденных бактерий рода *Salmonella*.

Навеску массой 25 г вносят в забуференную пептонную воду, затем инкубируют при температуре (37 ± 1)°C в течение (18 ± 2) ч. Для большего эффекта перед внесением навески продукта забуференную пептонную воду нагревают до температуры (37 ± 1)°C [18].

Забуференная пептонная вода соответствует рекомендациям ИСО (1993) и DIN Norms 10181 и 10160 по анализу молока и мяса, мясных продуктов соответственно. Забуференная пептонная вода для неселективного накопления бактерий предназначена для санитарно-бактериологических

исследований с целью неселективного накопления бактерий и репарации сублетально угнетенных клеток, в частности патогенных энтеробактерий.

Эта среда используется в качестве неселективного разбавителя, куда вносят исследуемый материал, согласно соответствующим документам [18, 19], и учитывают результаты, определяя наличие роста с последующим высевом на дифференциально-диагностические среды для выделения чистой культуры и дальнейшей ее идентификации.

Забуференная пептонная вода производства ФБУН ГНЦ ПМБ обеспечивает во всех засеянных пробирках при посеве в 9 мл среды по 1,0 мл микробной взвеси из разведения 10^{-7} через (18 ± 2) ч инкубации при температуре (37 ± 1)°C визуально обнаруживаемый рост каждого тест-штамма *E. coli* ATCC 25922, *S. enteritidis* 11272 и *S. typhimurium* 79 в виде диффузного помутнения среды.

ГОСТ 31659–2012 (ISO 6579:2002) «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*» рекомендует использование в качестве одной из сред селективного обогащения сальмонелл селенитовую среду [18].

Питательная среда для накопления сальмонелл (Селенитовый бульон) производства ФБУН ГНЦ ПМБ предназначена для санитарно-бактериологических исследований пищевых продуктов, объектов окружающей среды и других материалов с целью селективного накопления сальмонелл и последующим высевом на дифференциально-диагностические среды.

Совокупность компонентов, входящих в состав среды, обеспечивает питательные потребности для накопления сальмонелл. Бактерии восстанавливают гидроселенит натрия, образуя щелочь. Повышение pH уменьшает токсичность гидроселенита натрия, что способствует росту сопутствующей микрофлоры. Ферментация лактозы лактозоположительными микроорганизмами приводит к образованию кислоты, которая снижает pH, тем самым обеспечивая селективные свойства среды. Фосфатный буфер поддерживает требуемый pH и дополнительно стабилизирует токсичность гидроселенита натрия.

Исследуемый материал вносят в Селенитовый бульон согласно соответствующим документам [18, 20] и инкубируют 6 ч при температуре (37 ± 1)°C с последующим высевом на дифференциально-диагностические питательные среды, такие как агар Эндо (рис. 3 и 4), XLD-агар и др.

Показатель эффективности – не менее 10 (отношение среднего числа колоний *S. enteritidis* 11272 и *S. typhimurium* 79, выросших на чашках с агаром Эндо-ГРМ, либо на среде аналогичного назначения, после обогащения в течение 6 ч в Селенитовом бульоне, к среднему числу колоний, выросших до обогащения).

Показатель ингибиции – не менее 3 (отношение среднего числа колоний *E. coli* ATCC 25922, выросших на чашках с агаром Эндо-ГРМ, либо на среде аналогичного назначения, до обогащения в Селенитовом бульоне, к среднему числу колоний, выросших после обогащения в течение 6 ч).

4. Выявление *Listeria monocytogenes*

В продуктах массового потребления, для которых отсутствуют микробиологические нормативы, патогенные микроорганизмы, в т.ч. *Listeria monocytogenes*, не допускаются в 25 г продукта.

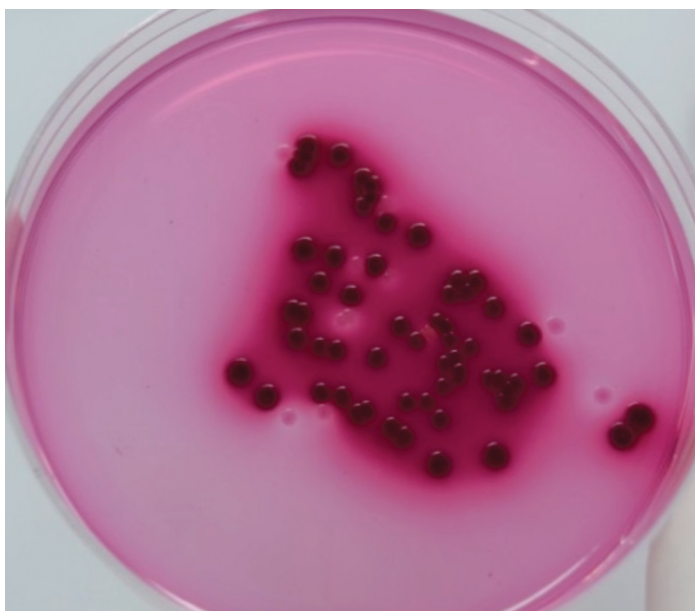


Рис. 3. Рост тест-штаммов *S. enteritidis* 11272 (бесцветные колонии) и *E. coli* ATCC 25922 (малинового цвета колонии) на агаре Эндо-ГРМ до обогащения в Селенитовом бульоне.

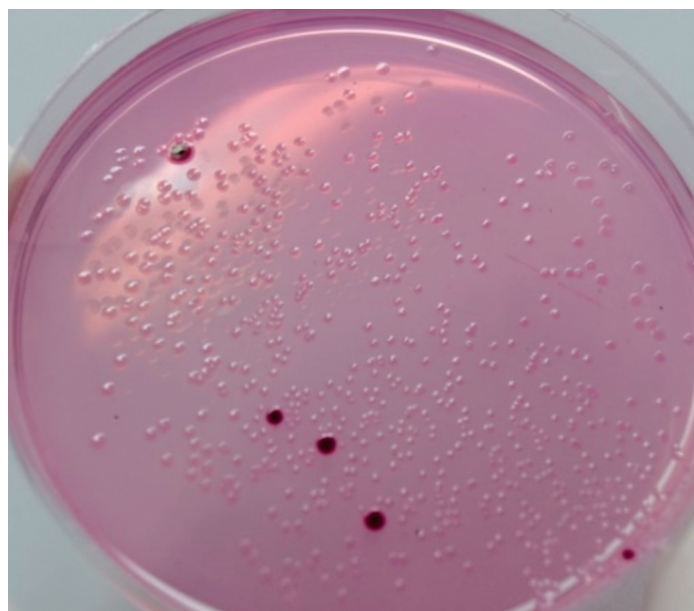


Рис. 4. Рост тест-штаммов *S. enteritidis* 11272 (бесцветные колонии) и *E. coli* ATCC 25922 (малинового цвета колонии) на агаре Эндо-ГРМ после инкубации в течение 6 ч в Селенитовом бульоне.

Анализы сырья, полуфабрикатов, готовой продукции на присутствие *Listeria monocytogenes* с применением сред обогащения, в том числе и Бульона UVM проводят согласно соответствующим нормативным документам [16, 21, 22].

Селективный бульон для обогащения листерий сухой (Бульон UVM) [16] применяется для санитарно-бактериологических исследований пищевых продуктов, объектов внешней среды и других объектов с целью селективного обогащения листерий.

Подготовленную для исследования навеску исследуемого продукта вносят в среду для первичного обогащения. Для посева берут 25 г (см³) продукта или 50–100 г (см³) продукта. Соотношение между инокулятом и питательной средой при посеве должно составлять 1 : 9 по объему. Посевы термостатируют при температуре 30°C. Для проведения вторичного обогащения 0,1 см³ культуры, полученной в результате первичного обогащения, пересевают в 10 см³ бульона. Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1)°C в течение (48 ± 2) ч. Двухэтапный накопительный метод используется при анализе образцов, сильно загрязненных сопутствующей микрофлорой.

Бульон UVM-I используется в качестве селективной среды первичного обогащения. Селективные свойства UVM-I обеспечиваются наличием в среде налидиксовой кислоты и акрифлавина. Бульон UVM-II используется в качестве селективной среды вторичного обогащения. Селективная добавка к UVM-II дополнительно содержит акрифлавин.

После накопления листерий в Бульонах UVM производят высев на селективный агар (ПАЛ, ПАЛКАМ агар и др.).

Высокое содержание питательных веществ и большая буферная емкость Бульона UVM производства ФБУН ГНЦ ПМБ создают оптимальные условия для роста листерий. Ингибиторы подавляют рост сопутствующей микрофлоры при селективном культивировании *Listeria*.

Бульон UVM обеспечивает во всех засеянных пробирках рост тест-штаммов *L. monocytogenes* 766 и *L. ivanovii* при посеве по 0,1 мл микробной взвеси в 10 мл среды из разведе-

дения 10⁻⁶ не позднее 48 ч инкубации при температуре (30 ± 1)°C в виде помутнения среды.

Ингибирующие свойства. Бульон UVM должен полностью подавлять во всех засеянных пробирках рост тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922, *B. cereus* NCTC 8035 и *S. aureus* ATCC 6538-P при посеве по 0,1 мл микробной взвеси в 10 мл среды из разведения 10⁻⁴ через 48 ч инкубации при температуре (30 ± 1)°C.

После обогащения (первичного или вторичного) листерий с селективных бульонов, независимо от наличия признаков роста, производят пересев по 0,1 см³ культуральной жидкости на поверхность дифференциально-диагностической среды – ПАЛКАМ-агар. Посев по поверхности питательной среды производят стерильным шпателем либо бактериологической петлей методом истощающего штриха [16, 21, 22]. Посевы термостатируют при (37 ± 1)°C в течение (24–48) ч. При обнаружении характерных колоний, подозрительных на листерию, проводят их дальнейшую идентификацию.

«Питательная среда для селективного выделения и идентификации листерий сухая (ПАЛКАМ-агар)» производства ФБУН ГНЦ ПМБ предназначена для санитарно-бактериологических исследований пищевых продуктов и других объектов с целью селективного выделения и идентификации видов *Listeria*.

Выделение листерий основано на их способности гидролизовать эскулин с образованием эскулетина, который в присутствии ионов железа образует серо-зеленый комплекс с почернением среды вокруг колоний (рис. 5, 6). Высокая селективность среды достигается за счет включения в состав полимиксина, акрифлавина, цефтазидима и хлорида лития.

ПАЛКАМ-агар с СД обеспечивает на всех засеянных чашках Петри при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10⁻⁶ не позднее 48 ч инкубации при температуре (37 ± 1)°C рост тест-штаммов *L. monocytogenes* 766 и *L. ivanovii* в виде круглых колоний, серо-зеленого цвета, с образованием вокруг колоний черной зоны, *L. monocytogenes* 766 диаметром 1,4–1,8 мм, *L. ivanovii* – 1,2–1,4 мм.

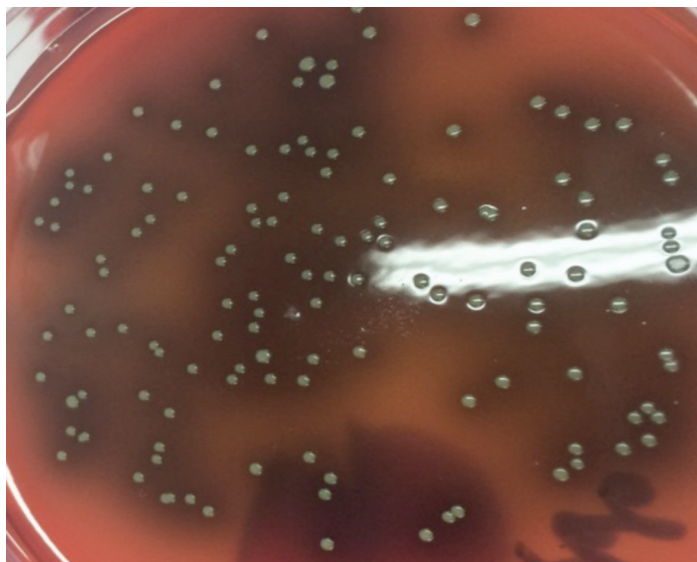


Рис. 5. Рост тест-штамма *L. monocytogenes* 766.

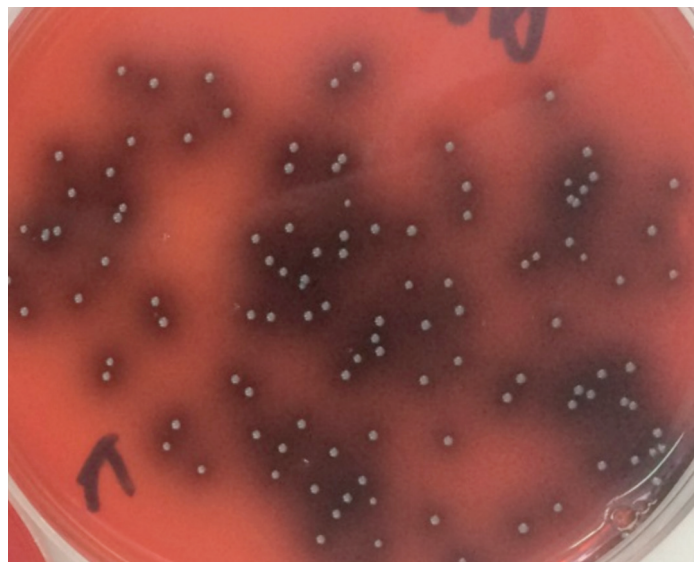


Рис. 6. Рост тест-штамма *L. Ivanovii*.

Среда подавляет рост тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 19433 (NCTC 775) и *S. aureus* ATCC 6538-P на всех засеянных чашках Петри при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10^{-4} через 48 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

5. Выявление и определение сульфитредуцирующих клостридий

Проникновение клостридий практически в любой пищевой продукт не представляет больших трудностей. Сложнее сохраниться в пищевом продукте в процессе его кулинарной обработки и приготовления с использованием высоких температур. Как только возникают неблагоприятные, опасные для возбудителя условия, он незамедлительно превращается в спорообразное состояние, а споры очень устойчивы и легко сохраняются в толще продукта и под вакуумной упаковкой. В процессе неправильного хранения продукта, особенно при комнатной температуре, дремлющие до поры споры активизируются и переходят в вегетативную форму, способную размножаться, выделяя при этом мощный токсин (яд), устойчивый к действию высоких температур. Размножению клостридий также способствует отсутствие свободного кислорода в толще пищевого продукта, и особенно в вакуумной упаковке. Действующими в нашей стране нормативными документами предусматривается контроль на наличие сульфитредуцирующих клостридий мясной и рыбной продукции, упакованной под вакуумом, сырокопченые колбасные изделия, изделия из мяса и рыбы, готовые к употреблению в потребительской таре (в т.ч. рыба сушеная), кулинарные изделия с термической обработкой, в том числе замороженные и т.д.

Методы выявления и определения количества сульфитредуцирующих бактерий основаны на высеве определенного количества продукта и (или) его разведений в питательные среды, культивировании посевов в оптимальных для роста условиях и, при необходимости, подсчета их количества и определения морфологических и биохимических свойств для подтверждения принадлежности сульфитредуцирующих бактерий к роду *Clostridium*. Метод посева в плотные пита-

тельные среды предназначен для пищевых продуктов, содержащих в 1 г твердого продукта не менее 150 или в 1 см³ жидкого продукта не менее 15 колониобразующих единиц (КОЕ) сульфитредуцирующих бактерий [23].

Для выявления присутствия (отсутствия) сульфитредуцирующих клостридий в определенном количестве продукта или его эквивалентное разведение вносят в одну из вязких питательных сред: железосульфитная среда, дифференциальная улучшенная клостридиальная среда, вязкая среда Вильсон-Блера. При этом соотношение между количеством посевного материала и питательной средой должно составлять 1 : 9. Посевы культивируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ не более 72 ч [13].

При определении сульфитредуцирующей способности микроорганизмов также используют глубокий способ культивирования в чашках Петри. При отсутствии анаэробстата на поверхность затвердевшей среды в чашки или пробирки наливают слой не менее 0,2 см голодного агара [24].

Если необходимо, для обеспечения гибели вегетативных форм или неспорообразующих форм бактерий применяют тепловую обработку исходной суспензии или жидкого продукта. Температура и время тепловой обработки варьируют от умеренного теплового пастеризационного эффекта (например, 75°C в течение 20 мин) до кипения в течение нескольких минут. В этом случае результат подсчета выражают как число спор сульфитредуцирующих бактерий, растущих в анаэробных условиях [23].

Железосульфитный агар предназначен для бактериологических исследований в санитарной и клинической микробиологии с целью выявления сульфитредуцирующих клостридий в пищевых продуктах, воде, почве; при микробиологической диагностике дисбактериоза кишечника, для научных исследований.

Железосульфитный агар производства ФБУН ГНЦ ПМБ выпускается в трех модификациях. При использовании среды в модификациях 1 и 2 исследуемый материал засевают в середину столбика среды, аккуратно перемешивая, и инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. При использовании среды в модификации 3 исследуемый материал засевают на

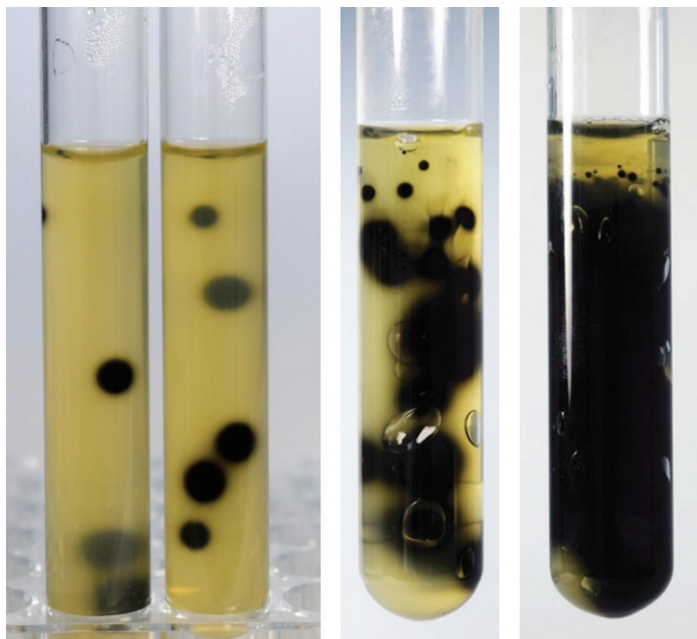


Рис. 7. Рост тест-штамма *C. perfringens* 13124 в железосульфитном агаре (модификация 1, 2).

чашки Петри и инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в анаэробных условиях.

Железосульфитный агар (модификация 1, 2) (рис. 7).

Рост тест-штамма *C. perfringens* 13124 при посеве из разведения 10^{-5} сопровождается образованием колоний черного цвета через 24 ч культивирования при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Модификация 3:

Тест-штамм *C. perfringens* 13124 образует колонии R-формы черного цвета или белого цвета с черным центром и частичным почернением среды через 24 ч культивирования в анаэробных условиях при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ (рис. 8).

Совокупность компонентов, входящих в состав питательной среды, обеспечивает питательные потребности для роста клостридий и их идентификации по сульфитредуцирующему признаку: способности редуцировать сульфит до сульфида, который с ионами железа образует черный преципитат.

6. Определение коагулазоположительных стафилококков

Среди микроорганизмов, вызывающих пищевые токсикозы, стафилококки занимают одно из первых мест. Заболевания возникают в результате употребления, прежде всего, молока и молочных продуктов, а также различных мясных изделий, содержащих токсины. Профилактика пищевых интоксикаций стафилококковой этиологии сводится к предотвращению обсеменения продуктов патогенными стафилококками, размножению их, а также к уничтожению возбудителя в продуктах питания. Необходимо строго соблюдать технологические режимы тепловой обработки продуктов и сроки хранения скоропортящейся продукции. Например, не допускается наличие стафилококков в 1,0 г колбасных изделий и продуктах из мяса, в 0,1 г мясных блюдах, готовых, быстрозамороженных, а также паштетах из печени и (или) мяса и т.д. [3]. Особое внимание уделяется микробиологическому контролю детских смесей на наличие стафилококков. Микробиологические показатели на продукты детского питания разработа-

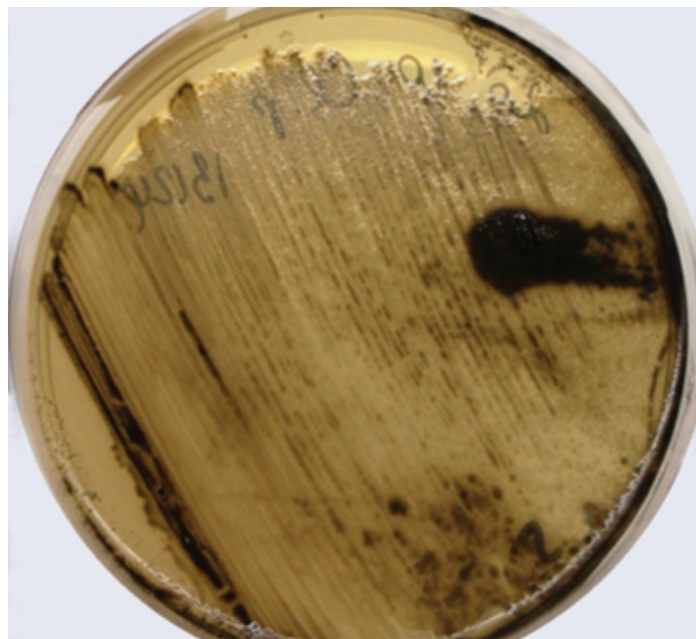


Рис. 8. Рост тест-штамма *C. perfringens* 13124 на железосульфитном агаре (модификация 3).

ны, с одной стороны, с учетом возрастных особенностей детей, для питания которых предназначаются эти продукты, с другой – с учетом степени термической обработки разведенного сухого продукта перед употреблением. Так, *S. aureus* должен отсутствовать в 10,0 г продукта без предварительной термической обработки продукта перед употреблением и в 1,0 г – после термической обработки ($80\text{--}100^\circ\text{C}$) [25].

Метод определения коагулазоположительных стафилококков основан на способности микроорганизмов из рода *Staphylococcus* расти на питательных средах с повышенным содержанием поваренной соли. Для первичного выделения стафилококков из исследуемого материала наиболее информативными и оптимальными являются дифференциально-диагностические среды: элективно-солевой агар, стафилококкагар и питательная среда №10 ГРМ, в которых элективность достигается высокой концентрацией хлористого натрия. Наибольшее санитарно-гигиеническое значение имеет *S. aureus* (золотистый стафилококк).

В последнее время все более широкое применение в практике врачей-бактериологов находят две среды – для селективного обнаружения патогенных маннитположительных стафилококков (агар Фогель–Джонсона) и для выделения и учета коагулазоположительных стафилококков (агар Байрд–Паркера). Обе среды содержат хлорид лития и теллурид калия для подавления роста сопутствующей микрофлоры. Наличие теллурита калия вызывает почернение колоний стафилококков [26].

Агар Байрд–Паркера производства ФБУН ГНЦ ПМБ предназначен для выделения и учета количества коагулазоположительных стафилококков в пищевых продуктах, фармацевтических и косметических продуктах, экологических пробах и др.

Агар Байрд–Паркера обеспечивает при посеве по 0,1 мл микробной взвеси каждого тест-штамма через (48 ± 3) ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ рост *S. aureus* «Виотко», *S. aureus* ATCC 6538-P, *S. aureus* Wood-46 из разведения

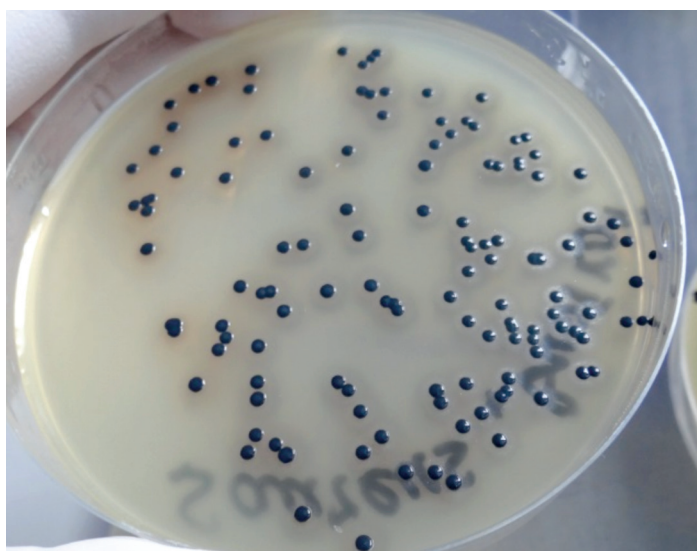


Рис. 9. Рост тест-штамма *S. aureus* «Виотко».

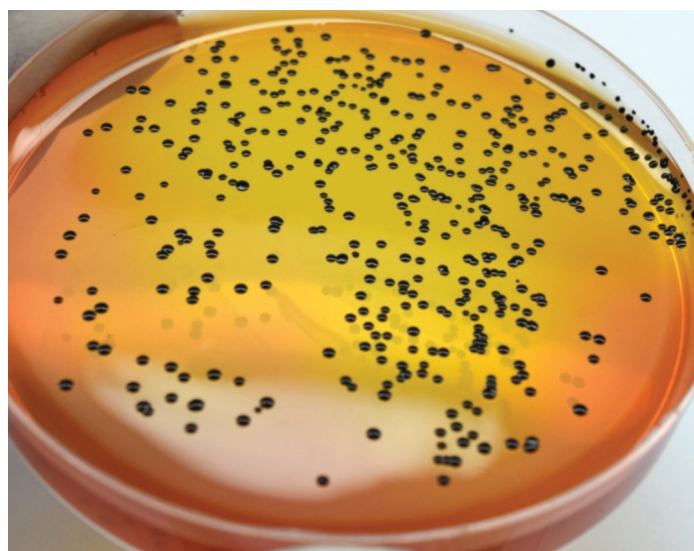


Рис. 10. Рост тест-штамма *S. aureus* ATCC 6538-P.

10^{-6} ; *S. epidermidis* ATCC 14990, *S. saprophyticus* CCM 883 из разведения 10^{-5} в виде:

- колонии *S. aureus* «Виотко» (рис. 9), *S. aureus* ATCC 6538-P, *S. aureus* Wood-46 – черного цвета с зоной липолиза и протеолиза, диаметром от 1,0 до 2,0 мм;

- колонии *S. epidermidis* ATCC 14990, *S. saprophyticus* CCM 883 – точечные колонии черного цвета.

Агар Байрд–Паркера подавляет рост и роение тест-штамма *Proteus mirabilis* 3177 из разведения 10^{-5} на всех засеянных чашках при посеве по 0,1 мл микробной взвеси через (48 ± 3) ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Питательный агар Фогель–Джонсона (производства ФБУН ГНЦ ПМБ) предназначен для выявления маннитположительных стафилококков из различных объектов при проведении бактериологического исследования. Агар Фогель–Джонсона обеспечивает визуально обнаруживаемый рост *S. aureus* «Виотко», *S. aureus* ATCC 6538-P, *S. aureus* Wood-46, *S. epidermidis* ATCC 14990, *S. saprophyticus* CCM 883 при посеве по 0,1 мл микробной взвеси каждого тест-штамма из разведения 10^{-5} через 48 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$:

- колонии *S. aureus* «Виотко», *S. aureus* ATCC 6538-P (рис. 10), *S. aureus* Wood-46, *S. saprophyticus* CCM 883 – черного цвета с желтой зоной, диаметром от 0,5 до 2,0 мм;

- колонии *S. epidermidis* ATCC 14990 – черного цвета, диаметром от 0,5 до 1,0 мм.

Агар Фогель–Джонсона подавляет рост тест-штамма *P. mirabilis* 3177 из разведения 10^{-4} на всех засеянных чашках при посеве по 0,1 мл микробной взвеси через 48 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

В настоящее время на предприятиях пищевой промышленности постоянно совершенствуются и создаются новые технологии, расширяется ассортимент выпускаемой продукции, которая должна оставаться качественной в процессе длительного хранения и быть безопасной для потребителя. ФБУН ГНЦ ПМБ, являющийся одним из основных производителей питательных сред в Российской Федерации, непрерывно расширяет номенклатуру современных питательных сред, необходимых для обеспечения бактериологических лабораторий предприятий пищевой отрасли.

Литература

1. Правительство Российской Федерации. Распоряжение N 1364-р от 29 июня 2016 года «Об утверждении Стратегии повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года».
2. Кодекс Алиментариус. Общие принципы гигиены пищевых продуктов. М.: «Весь мир», 2006, с. 7-8.
3. Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к продукции (товарам), подлежащей санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) (с изменениями на 10 ноября 2015 года) Глава II Раздел 1. Требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов, с. 15-16
4. ТР ТС 021/2011. О безопасности пищевой продукции.
5. ТР ТС 023/2011. Технический регламент на соковую продукцию из фруктов и овощей.
6. ТР ТС 024/2011. Технический регламент на масложировую продукцию.
7. ТР ТС 033/2013. О безопасности молока и молочной продукции.
8. ТР ТС 034/2013. О безопасности мяса и мясной продукции.
9. Хаджибаева ИФ, Рокутова АВ, Омарова ДТ, Клипина НВ. *Enterobacter sakazakii* – новый возбудитель пищевой токсикоинфекции у детей (Обзор современной литературы). Медицина. 2013;4:27.
10. ГОСТ 10444.15-94. Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. М.: Стандартинформ, 2010, с. 7.
11. ГОСТ 26670-91. Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов. М.: Стандартинформ, 2008, с. 7.
12. ГОСТ Р 50396.1-2010. Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты из мяса птицы. Метод определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. М.: Стандартинформ, 2011, с. 6
13. Руководство по медицинской микробиологии. Книга 1. Общая и санитарная микробиология. Под редакцией А.С.Лабинской, Е.Г.Волиной. М.: БИНОМ, 2008, с. 929.
14. Методические указания по санитарно-бактериологическому контролю на предприятиях общественного питания и торговли пищевыми продуктами (№26571982 г).
15. ГОСТ 31708-2012 (ISO 7251:2005) Микробиология пищевых продуктов и кормов. Метод обнаружения и определения количества presumptivных бактерий *Escherichia coli*.
16. ГОСТ ISO 11133-2-2011. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству пита-

- тельных сред. Часть 2. Практические руководящие указания по эксплуатационным испытаниям питательных сред. М.: Стандартинформ, 2013.
17. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы «Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. СанПиН 2.3.2.1078-01 (с изменениями на 6 июля 2011 г)».
 18. ГОСТ 31659-2012. Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*.
 19. ГОСТ Р 54085-2010. Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Shigella*.
 20. МУ 4.2.2723-10 Лабораторная диагностика сальмонеллезов, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды.
 21. ГОСТ 32031-2012. Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*.
 22. МУК 4.2.1122-02. Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах.
 23. ГОСТ 29185-2014 (ISO 15213:2003). Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета сульфитредуцирующих бактерий, растущих в анаэробных условиях.
 24. ГОСТ 7702.2.6-2015. Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты из мяса птицы. Методы выявления и определения количества сульфитредуцирующих клостридий.
 25. МУК 4.2.577-96. Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов.
 26. Шепелин АП, Полосенко ОВ, Марчихина ИИ, Шолохова ЛП, Дятлов ИА. Питательные среды для выявления стафилококков в клинической и санитарной микробиологии. Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. 2015;4(56):39-43.
 27. Шепелин АП, Домотенко ЛВ, Дятлов ИА, Миронов АЮ, Алешкин ВА. Современные подходы к проблеме импортозамещения в области производства питательных сред. Клиническая лабораторная диагностика. 2015;60(6):63-5.
 13. *Rukovodstvo po meditsinskoj mikrobiologii [Medical Microbiology]*. In: *Obshchaya i sanitarnaya mikrobiologiya [General and Sanitary Microbiology]*. Ed by A.S.Labinskaya, E.G.Volina. Moscow: "BINOM" Publ., 2008, pp. 929. (In Russian).
 14. *Methodological guidelines for sanitary-bacteriological control at the enterprises of public catering and food trade (№ 26571982 г)*. (In Russian).
 15. *GOST 31708-2012 (ISO 7251:2005). Microbiology of food and animal feed. A method of detecting and quantifying bacteria presumptuous *Escherichia coli**. (In Russian).
 16. *GOST ISO 11133-2-2011. Microbiology of food and animal feed. Guidelines for the preparation and production of culture media. Part 2. Practical guidelines on performance testing of culture media*. Moscow: "Standartinform" Publ. (In Russian).
 17. *Sanitary-epidemiological norms "Hygienic requirements to safety and nutritional value of foods. SanPiN 2.3.2.1078-01 (as amended on July 6, 2011)"*. (In Russian).
 18. *GOST 31659-2012. Food. Method of detecting bacteria of the genus *Salmonella**. (In Russian).
 19. *GOST R 54085-2010. Food. Method of detecting bacteria of the genus *Shigella**. (In Russian).
 20. *MU 4.2.2723-10 Laboratory diagnosis of salmonellosis detection of *Salmonella* in food and environmental objects*. (In Russian).
 21. *GOST 32031-2012. Food. Methods of identifying bacteria *Listeria monocytogenes**. (In Russian).
 22. *MUK 4.2.1122-02. Organization of control and methods for detection of bacteria *Listeria monocytogenes* in food*. (In Russian).
 23. *GOST 29185-2014 (ISO 15213:2003). Microbiology of food and animal feed. Methods of identifying and counting sulfitereducing bacteria growing under anaerobic conditions*. (In Russian).
 24. *GOST 7702.2.6-2015. Methods to identify and quantify sulfitereducing *Clostridium**. (In Russian).
 25. *MUK 4.2.577-96. Methods of microbiological control of products for children, therapeutic feeding and their components*. (In Russian).
 26. *Shepelin AP, Polosenko OV, Marchikhina II, Sholokhova LP, Dyatlov IA. Culture media for detection of staphylococci in clinical and sanitary microbiology. Biopreparaty. Profilaktika. Diagnostika. Lechenie. 2015;4(56):39-43*. (In Russian).
 27. *Shepelin AP, Domotenko LV, Dyatlov IA, Mironov AYU, Aleshkin VA. The actual approaches to problem of import substitution in th field of production growth medium. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2015;60(6):63-5*. (In Russian).

References

1. The Government of The Russian Federation. Order N 1364-R dated June 29, 2016 "On approval of the Strategy of improving the quality of food products in the Russian Federation until 2030». (In Russian).
2. *Kodeks Alimentarius. Obshchie printsipy gigeny pishchevykh produktov*. Moscow: «Ves' mir» Publ., 2006, pp. 7-8. (In Russian).
3. *Uniform sanitary and epidemiological and hygienic requirements for products (goods) subject to sanitary-epidemiological supervision (control) (amended on 10 November 2015) Chapter II. Section 1. Safety requirements and nutritional value of foods*, pp. 15-16. (In Russian).
4. *TR TS 021/2011. On safety of food products*. (In Russian).
5. *TR TS 023/2011. Technical regulations for juice products from fruits and vegetables*. (In Russian).
6. *TR TS 024/2011. Technical regulations for oil and fat products*. (In Russian).
7. *TR TS 033/2013. On safety of milk and dairy products*. (In Russian).
8. *TR TS 034/2013. On safety of meat and meat products*. (In Russian).
9. *Khadzhibavaeva IF, Rokutova AV, Omarova DT, Klipina NV. *Enterobacter sakazaki* – new pathogen of nutritional toxicoinfection of children (review of modern literature)*. *Meditsina*. 2013;4:27. (In Russian).
10. *GOST 10444.15-94. Food. Methods for determination quantity of mesophilic aerobic and facultative anaerobic microorganisms*. Moscow: "Standartinform" Publ., 2010, pp. 7. (In Russian).
11. *GOST 26670-91. Food. Methods of cultivation of microorganisms*. Moscow: "Standartinform" Publ., 2008, pp. 7. (In Russian).
12. *GOST R 50396.1-2010. Method of determining quantity of mesophilic aerobic and facultative anaerobic microorganisms*. Moscow: "Standartinform" Publ., 2011, pp. 6 (In Russian).

Информация об авторах:

Дятлов Иван Алексеевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Полосенко Ольга Вадимовна, кандидат биологических наук, заведующая сектором микробиологических исследований ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0017
E-mail: polosenko@obolensk.org

Information about authors:

Ivan A. Dyatlov, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med), Professor, Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Olga V. Polosenko, Ph.D., Chief of Microbiological Research Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: 142279 Obolensk, Serpukhov District, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0017
E-mail: polosenko@obolensk.org