

**СУЧАСНІ МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ ТА ЇХ  
МЕТАБОЛІТІВ У ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ  
04.02. – ДР.003-О 21.02.03.006**

**Виконавець:**

здобувач IV курсу \_\_\_\_\_ **Л. А. МЕНЬШАКОВА**

**Науковий керівник:**

доцент \_\_\_\_\_ **О. І. ЮЛЕВИЧ**

**Рецензент:**

к.б.н., д.с.-г.н., доцент \_\_\_\_\_ **В.О. Мельник**

**Миколаїв 2021**

**ЗМІСТ**

Реферат	3
Вступ	5
1. Літературно-патентний огляд	7
1.1 Державне регулювання безпеки харчових продуктів	7
1.2 Мікроорганізми в харчових продуктах	10
1.2.1 Мікроорганізми в молочній промисловості	10
1.2.2 Мікроорганізми в виробництві м'ясних продуктів	16
1.2.3 Мікроорганізми в хлібопекарній промисловості	17
1.3 Методи визначення мікроорганізмів та їх метаболітів в харчових продуктах	22
2. Експериментальна частина	27
2.1 Об'єкти і методи дослідження	27
2.1.1 Об'єкти дослідження	27
2.1.2 Методи дослідження	27
2.2 Результати та їх обговорення	28
3. Технологічна частина	39
4. Безпека життєдіяльності	43
Висновки	48
Список використаної літератури	49

## РЕФЕРАТ

Тема випускної кваліфікаційної роботи: «Сучасні методи визначення мікроорганізмів та їх метаболітів у харчових продуктах».

Випускна кваліфікаційна робота виконана на 52 сторінках друкованого тексту. Вона включає наступні розділи: реферат, вступ, літературно-патентний огляд, експериментальну частину, технологічну частину, безпеку життєдіяльності, висновки та перелік використаної літератури. Для написання випускної кваліфікаційної роботи було використано 31 бібліографічних найменувань. Робота містить 7 рисунків, 1 таблицю.

Ключові слова: *мікроорганізми, харчові продукти, Staphylococcus aureus, E. Coli, методи дослідження, об'єкт дослідження, збудник, лабораторія, поживне середовище.*

Об'єктом досліджень у роботі були методи виявлення мікроорганізмів та їх метаболітів у харчових продуктах, а також оцінка ефективності цих методів.. Розглядалися традиційні та сучасні методи визначення вмісту сторонньої мікрофлори у продуктах харчування. Оцінювалися складність методики, тривалість проведення досліджень, точність отриманих результатів, можливість застосування у різних видах виробництв.

Метою випускної кваліфікаційної роботи є оцінка ефективності сучасних методів визначення мікроорганізмів та їх метаболітів у харчових продуктах.

Завданнями випускної кваліфікаційної роботи є: охарактеризувати ефективності методів виявлення мікроорганізмів та їх метаболітів у харчових продуктах, визначити види мікроорганізмів в харчових продуктах, оцінити вплив мікроорганізмів та їх метаболітів на якість харчових продуктів. Розглядалися традиційні та сучасні методи визначення вмісту сторонньої мікрофлори у продуктах харчування.

Для підвищення якості продукції, що випускається, існує необхідність розробки швидких методів визначення мікробіологічної чистоти готових продуктів, при цьому дані методи повинні бути надійними, чутливими і здатними виявити широкий спектр мікроорганізмів.

Розглянуто традиційні та сучасні методи дослідження *Staphylococcus aureus* та *E. coli*, та проведено порівняльну характеристику ефективності традиційних та сучасних методів досліджень *E. coli* та *Staphylococcus aureus*.

Застосування тест-системи RIDA ®COUNT для виявлення *E. coli* у продуктах харчування дозволяє скоротити час випробувань порівняно з традиційними методами проведення досліджень у 6-16 разів.

Аналіз мікробіологічних показників золотистого стафілокока у харчових продуктах за допомогою петріфільмів Petrifilm ТМ триває 2-4 години, що у 18 разів менш ніж при використанні традиційного методу досліджень.

## ВСТУП

Забезпечення мікробіологічної безпеки харчових продуктів є одним з пріоритетних завдань, вирішення якого безпосередньо спрямоване на охорону

здоров'я населення. У всьому світі дана проблема набуває особливої актуальності у зв'язку зі збільшенням числа захворювань, що передаються через харчові продукти.

Проблема мікробіологічної безпеки харчових продуктів зростає на основі генетичної трансформації мікроорганізмів, обумовленої екологічними і технологічними факторами. Сучасні підходи до організації системи безпечності харчових продуктів вимагають детального дослідження екології нових патогенів, біохімічних і генетичних механізмів їх вірулентності, а також регулюючої ролі технологічних чинників в умовах виробництва. Це обґрунтовує необхідність розробки нових критеріїв в системі санітарно-епізоотичного контролю продовольчої сировини і готової продукції, у тому числі на основі створення і впровадження більш чутливих і ефективних методів мікробіологічного аналізу.

Необхідно зазначити, що проблема харчових інфекцій, включаючи і харчові зоонози, має глобальний характер, її розв'язання координується Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ), Продовольчою та сільськогосподарською організацією (ФАО), Європейським органом з безпечності харчових продуктів (EFSA) [4].

Незважаючи на значний прогрес у розробці прискорених методів виявлення мікроорганізмів, традиційне дослідження з використанням специфічних культуральних середовищ залишається основою для виявлення мікроорганізмів. При цьому робляться спроби удосконалити методи на основі агарових середовищ так, щоб вони стали більш зручними для використання.

Виробництво харчових продуктів, вимагає скорочення терміну мікробіологічних досліджень, проведення яких традиційними методами забирає щонайменше 4 доби. Ці методи не відповідають сучасним вимогам до моніторингу технологічного процесу виготовлення продуктів, оскільки не дозволяють оперативно одержувати необхідну інформацію та вживати коригуючих заходів, виправити будь-які недоліки в гігієні даного виробництва. Тому для підвищення якості продукції, що випускається, існує необхідність розробки швидких методів визначення мікробіологічної чистоти готових продуктів, при цьому дані методи повинні бути надійними, чутливими і здатними виявити широкий спектр мікроорганізмів.

Тому метою дипломної роботи було оцінка ефективності методів визначення мікроорганізмів та їх метаболітів у харчових продуктах.

Були поставлені наступні завдання:

- державне регулювання щодо безпеки харчових продуктів.
- визначити види мікроорганізмів в харчових продуктах;
- оцінити вплив мікроорганізмів та їх метаболітів на якість харчових продуктів;
- розглянути методи визначення мікроорганізмів та їх метаболітів в харчових продуктах;
- розглянути традиційні методи мікробіологічних досліджень;
- розглянути сучасні методи для індикації мікроорганізмів та оцінити їх ефективність;

## 1. Літературно-патентний огляд

### 1.1 Державне регулювання безпеки харчових продуктів

Забезпечення мікробіологічної безпеки харчових продуктів є одним з пріоритетних завдань, вирішення якого безпосередньо спрямоване на охорону здоров'я населення. У всьому світі дана проблема набуває особливої актуальності у зв'язку зі збільшенням числа захворювань, що передаються через харчові продукти [4].

Продукти та напої, які ми вживаємо, є одними з основних факторів, які впливають на здоров'я та самопочуття людини. Саме з їжею організм отримує необхідну кількість поживних речовин, мікроелементів та вітамінів, які необхідні для нормального функціонування органів та систем. При цьому одним із найважливіших якісних показників, які забезпечують користь від продуктів або напоїв, є їх безпечність. Одним з критеріїв, за якими оцінюють безпечність продукту, є оцінка ризиків, які пов'язані з виробництвом, споживанням та реалізацією продуктів харчування. За сучасним визначенням ризиком можна назвати імовірність нанесення продуктом або напоєм шкоди життю або здоров'ю людей, які їх вживають. Сьогодні споживачі почали звертати більше уваги на якісний склад свого раціону, що потребує комплексного проактивного підходу до виробництва на усіх його етапах з метою попередження та зниження ризику харчових забруднень [1].

Світові організації, сфера діяльності яких пов'язана з охороною здоров'я, прискіпливо ставляться до якості харчових продуктів та розробляють документи, які регламентують критерії користі та безпечності продуктів та напоїв. Зокрема, Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) представила своє бачення щодо безпеки харчових продуктів у «Глобальній стратегії ВООЗ в галузі безпеки харчових продуктів», яка була оприлюднена у 2002 році на прохання Всесвітньої асамблеї охорони здоров'я.

ВООЗ та її держави-члени признають безпеку харчових продуктів як одну з основних функцій суспільної охорони здоров'я. Саме тому така значна увага приділяється мікробіологічному забрудненню продуктів та способам його попередження [3].

Однією з цікавих та важливих тем при контролі безпеки харчових продуктів та напоїв є оцінка ризиків, тобто можливості погіршення здоров'я людини при їх вживанні. Серед ризиків виділяють: біологічні, хімічні та фізичні, а також стан харчових продуктів.

Мікробіологічні ризики та захворювання харчового походження, які є їх результатом, на сьогодні є нагальною проблемою системи охорони здоров'я будь-якої країни, адже протягом останніх десятиріч кількість захворювань, викликаних мікроорганізмами, які передаються через їжу, значно збільшилася.

Після вступу до СОТ Україна повинна здійснювати подібний контроль на своїй території у відповідності з вимогами Європейського законодавства, зокрема Регламенту (ЄС) № 178/2002 про безпеку харчових продуктів [1], Регламенту (ЄС) № 882/2004 про офіційний контроль імпорту продуктів

харчування і кормів з третіх країн[17], Ради (ЄС) № 852/2004 щодо гігієни харчової продукції [3] та Регламенту (ЄС) 1831/2003 про гігієну кормів[4].

Безпечність харчових продуктів і кормів, головним чином, забезпечується за допомогою профілактичного підходу, такого як реалізація належної гігієнічної практики (GHP) та застосування процедур, що ґрунтуються на принципах системи аналізу ризиків та критичних контрольних точок (НАССР).

Якість харчових продуктів – це набір характеристик і властивостей продукції, очікуваних споживачем, але не пов'язаних з її безпечністю.

Характеристики якості використовуються з метою надання гарантій щодо певних властивостей продуктів для вразливих груп споживачів, продукції для спеціального харчування, для аутентифікації продуктів і визначення додаткових вимог до їх маркування, або для свіжих фруктів та овочів.

Модернізація системи безпечності і якості харчових продуктів і кормів дасть змогу забезпечити продовольчу безпеку України [4].

Безпечність харчових продуктів – це гарантія того, що продукти не нашкодять споживачеві та навколишньому середовищу при їх виробництві, приготуванні або споживанні відповідно до їх призначення.

Законодавче регулювання зазвичай обмежується основними вимогами до безпечності, які встановлюються в обов'язкових галузевих директивах ЄС.

Станом на початок серпня 2018 року розроблено та запроваджено:

- Закон України «Про основні принципи та вимоги до безпечності та якості харчових продуктів»;
- Закон України «Про основні принципи та вимоги до органічного виробництва, обігу та маркування органічної продукції»;
- Закон України «Про інформацію для споживачів харчових продуктів»;
- Закон України «Про внесення змін до деяких законів України щодо відстеження і маркування ГМО в харчових продуктах, кормах, ветеринарних препаратах» та ін.

Ефективна гармонізація національних вимог до якості та безпечності харчових продуктів з вимогами ЄС буде сприяти запровадженню ефективної європейської системи державного контролю безпечності та якості харчових продуктів за принципом «від лану до столу», підвищенню загальної безпечності харчових продуктів, захисту життя і здоров'я людей, захист інтересів споживачів, в тому числі шляхом надання їм належної інформації про харчові продукти, прозорі умови для аграрного та харчового бізнесу, підвищення його конкурентоспроможності та розширення доступу на ринок ЄС і міжнародні ринки збуту харчової продукції.

Виробництво харчових продуктів, вимагає скорочення терміну мікробіологічних досліджень, проведення яких традиційними методами забирає щонайменше 4 доби. Ці методи не відповідають сучасним вимогам до моніторингу технологічного процесу виготовлення м'ясних продуктів, оскільки не дозволяють оперативно одержувати необхідну інформацію та вживати коригуючих заходів, виправити будь-які недоліки в гігієні даного виробництва. Тому для підвищення якості продукції, що випускається, існує необхідність розробки швидких методів визначення мікробіологічної чистоти

готових продуктів, при цьому дані методи повинні бути надійними, чутливими і здатними виявити широкий спектр мікроорганізмів [17].

## **1.2 Мікроорганізми в харчових продуктах**

### **1.2.1. Мікроорганізми в молочній промисловості**

При виробництві кисломолочних продуктів і визріванні сирів основну роль відіграють процеси бродіння, які проводять молочнокислі, пропіоновокислі, оцтовокислі бактерії, дріжджі, бактерії групи кишкових паличок та інші мікроорганізми. Крім того, при визріванні сирів та деяких молочних продуктів іде процес розщеплення білків під дією ферментів молочнокислих бактерій. Розпад білків може відбуватися під дією протеолітичних ферментів сторонньої мікрофлори – мікрококів, дріжджів, гнильних плісняв та ін., що призводить до псування продукту. При виробництві і зберіганні молока і молочних продуктів може відбуватись ліполіз і окислення під дією ферментів, які виробляють психротрофні, плісняви та інші мікроорганізми [18].

Усі мікроорганізми, які зустрічаються у молоці та молочних продуктах і впливають на формування якості продукції, можна поділити на три групи: технічно важлива мікрофлора; патогенні; санітарно-показові.

До першої групи відносять мікроорганізми, які входять до складу заквасок, і які викликають вади. Представники цієї групи можуть відігравати як позитивну, так і негативну роль у формуванні якості молочних продуктів. Так, молочнокислі бактерії, які беруть участь у сквашуванні молока, можуть викликати прокисання продукту. Дріжджі беруть участь у визріванні кефіру, кумису, ацидофільно-дріжджового молока, але можуть викликати здуття при їх надлишку у продукті. Оцтовокислі мікроорганізми входять до складу кефірних грибків, але можуть викликати вади смаку кисломолочного сиру і сметани [20].

Санітарно-показові мікроорганізми використовують, в основному, для оцінки санітарного стану підприємств і дотримання санітарно-гігієнічних та технологічних режимів виробництва. Присутність санітарно-показових мікроорганізмів свідчить про ступінь забрудненості молока виділеннями людини і тварин.

Технічно важлива мікрофлора. Молочнокислі бактерії – це специфічна група мікроорганізмів, які обумовлюють молочнокисле бродіння, тобто розпад вуглеводів до молочної кислоти. Залежно від шляху, яким бактерії ведуть процес бродіння (гліколітичний або пентозофосфатний), утворюється різна кількість молочної кислоти, а мікроорганізми розподіляються на гомо- та гетероферментативні. Поруч з основним продуктом метаболізму молочнокислі бактерії можуть утворювати побічні: етанол, оцтову кислоту, CO<sub>2</sub>, ароматичні речовини [21].

Молочнокислі бактерії – це основна мікрофлора, яка використовується при виробництві молочних продуктів. У природі молочнокислі мікроорганізми представлені кулькоподібними і паличкоподібними. За останньою

класифікацією, наведеною у Визначнику Bergey (Берджи), молочнокислі бактерії віднесені до двох окремих родин – *Streptococcaceae* та *Lactobacillaceae*. Деякі вчені і на цей час відносять молочнокислі палички до родини *Lactobacteriaceae*, урахувавши те, що ці мікроорганізми не утворюють спор. Усі молочнокислі бактерії, незалежно від класифікації, мають спільні властивості – позитивно забарвлюються за Грамом (Гр+), не утворюють спор, нерухомі, не викликають видимого розпаду білків, факультативні анаероби [18].

Рід *Lactococcus* (від грец. lactococcus – молочний) включає п'ять видів типових лактококів *Lac. lactis*. Розвиваючись у молоці, лактококи викликають його згортання, утворення рівного, без відділення сироватки щільного згустку, який має приємний кисломолочний смак і запах. Ароматизуючий лактокок утворює згусток, у якому можна знайти в невеликій кількості бульбашки вуглекислого газу

Рід *Leuconostoc* (від грец. leucos – білий, безбарвний; nostoc – водорості, узагальнена назва; leuconostoc - безбарвні слизисті рослини) об'єднує 9 видів. У молочній промисловості має значення вид *Leu. mesenteroides*, він включає три підвиди: *Leu. dextranicum*, *Leu. cremoris*, *Leu. Mesenteroides*. Молоко є бідним поживним середовищем для розвитку лейконостоков. Більшість штамів ростуть у молоці при додаванні ростових чинників, екстракту дріжджів і глюкози.

У рід *Streptococcus* входить один вид молочнокислих коків – *Streptococcus thermophilus* (термофільний стрептокок). Він утворює в невеликій кількості ацетон, тому займає проміжне місце між гомо- і гетероферментативними стрептококами. У зв'язку з цим його відносять до факультативних, гетероферментативних молочнокислих стрептококів [20].

Добре росте на знежиреному і гідролізованому молоці, також на щільних середовищах, що містять компоненти молока і ростові чинники. Інтенсивний ріст термофільних стрептококів спостерігається при додаванні до живильних середовищ основних амінокислот – ваніліну, лейцину, ізолейцину, лізину, аргініну, метіоніну, гістидіну. У рідких середовищах росте так само, як і лактококи. На поверхні щільних живильних середовищ термофільний стрептокок утворює дуже дрібні колонії округлої форми із зернистою структурою.

У зв'язку з великою кількістю видів молочнокислих паличок, при їх класифікації та ідентифікації виділених штамів останнім часом, окрім морфологічних особливостей, культуральних властивостей і ферментативної активності (феіотипічні властивості), враховують також генотипічні особливості: вміст гуаніна з цитозіном (Г+Ц) в молекулі ДНК виражено в мольпроцентах, гомології ДНК/ДНК різних штамів і видів, складі і розташуванні амінокислот міжпептидних зв'язків у пептидоглікані клітинної стінки (тип пептидоглікана) і ін [21].

Молочнокислі палички (лактобактерії) відносять до сімейства *Lactobacteriaceae*, роду *Lactobacterium*. У зв'язку з тим, що молочнокислі палички спор не утворюють і тому не є бацилами, їх необхідно відносити до роду *Lactobacterimn*.

*L. acidophilum* є кишковим мікробом, який можна виділити із вмісту травного тракту людини і різних тварин. Ацидофільна паличка здатна після культивування в молоці знов існувати в кишечнику людини і пригнічувати там розвиток патогенних і небажаних мікроорганізмів (сальмонели, шигели, стафілококи) [15].

Стрептобактерії володіють менш вираженою кислотоутворюючою здатністю. Стрептобактерії володіють добре вираженими сахаролітичними властивостями. Вони досить активно ферментують лактозу, фруктозу, галактозу, маніт, манозу, рибозу, саліцин та ін. Глюкозу зброджують без утворення газу. Деякі штами *Lbm. plantarum* викликають утворення іржавих плям на поверхні сирів [12].

Пропіоновокислі бактерії відносять до сімейства *Propionibacteriaceae*, роду *Propionibacterium*, який включає дві основні групи мікроорганізмів, виділені з різних природних середовищ.

Пропіоновокислі бактерії є факультативними анаеробами, але варіабельними по аеротолерантності. Більшість культур росте тією чи іншою мірою на повітрі, хоча більшість штамів швидко росте в строго анаеробних умовах.

Пропіонобактерії є хемоорганотрофами. Продукти ферментації включають велику кількість пропіона і оцтової кислоти, менше ізовалеріанової, мурашиної, янтарної, молочної кислот і діоксиду вуглецю [20].

Дріжджі є основними збудниками спиртного бродіння. Найбільше значення в харчовій і молочній промисловості має сімейство *Saccharomycetaceae*, рід *Saccharomyces*. До цього роду належать і молочні дріжджі *S. lactis*, *S. casei*, які можуть розвиватися в сирах і кисломолочних продуктах. Дріжджі роду *Candida* можуть існувати в дріжджовій і ниткоподібних формах. На рідких живильних середовищах такі скупчення клітин утворюють плівку

Більшість дріжджів віддає перевагу для свого розвитку кислій реакції середовища, тому вони дуже поширені в кисломолочних продуктах і можуть бути знайдені майже в будь-якому продукті, виготовленому на природних заквасках. Проте дріжджі розвиваються повільніше, ніж лактобактерії, у зв'язку з чим їх виявляють у меншій кількості, ніж молочнокислі бактерії.

При рості на щільних живильних середовищах, а також на продуктах дріжджі роду *Rhodotorula* утворюють колонії, забарвлені в червоний, рожевий або жовтий колір [10].

Маслянокислі бактерії є збудниками маслянокислого бродіння, в результаті якого молочний цукор і солі молочної кислоти (лактати) розщеплюються з утворенням великої кількості різних кислот, спиртів, CO<sub>2</sub> та H<sub>2</sub>. Їх відносять до роду *Clostridium* [8].

Продуктами метаболізму є масляна, оцтова, пропіонова, мурашина кислоти, етиловий, бутиловий, пропіловий спирти. Бродіння супроводжується виділенням CO<sub>2</sub> та H<sub>2</sub>. Внаслідок сильного газоутворення у сирах викликають ваду – пізніе здуття. Це пов'язано з повільним ростом маслянокислих бактерій



при бурхливому рості молочнокислих. Внаслідок розвитку маслянокислих сир набуває неприємного смаку і запаху. Мають високу протеолітичну активність.

Маслянокислі мікроорганізми можуть попадати в молоко з частинками кормів, гною, ґрунту. Отже, дотримання чистоти є основним заходом у боротьбі з забрудненням молока цією мікрофлорою [11].

Бактерії роду *Pseudomonas* накопичуються у сирому молоці при тривалому його зберіганні при низьких температурах. Під час пастеризації вони гинуть, але ферменти, які вони встигли накопичити (ліпази і протеази), термостійкі, витримують температуру пастеризації, навіть УВТ-обробку. Тому при зберіганні пастеризованого, стерилізованого молока, згущених молочних консервів можуть виникати вади – гіркий і прогірклий смак.

Бактерії роду *Pseudomonas* чутливі до пониження рН середовища, тому в кисломолочних продуктах вони не розмножуються. Деякі виробляють фосфатазу в пастеризованих не кисломолочних продуктах [14].

Зустрічаються у ґрунті, воді, рослинах. Вважають, що в молоко попадають з залишками води. Для боротьби треба воду обробляти хлорним вапном.

Усі спороутворюючі мікроорганізми негативно реагують на кисле середовище, тому вони проявляють себе тільки у тих випадках, коли у молоці і молочних продуктах молочнокислі мікроорганізми не розвиваються. Деякі із них виділяють сичужний фермент і згортають молоко при низькій кислотності.

Спороутворюючі мікроорганізми викликають вади – згортання, протеоліз, пептонізацію, гіркоту. Ці вади можуть бути у пастеризованому і стерилізованому, стерилізованому концентрованому молоці, вершках [26].

Плісенішироко розповсюджені у виробництві кисломолочних продуктів, сирів і молочних консервів. Вони викликають пліснявіння при зберіганні продуктів.

Плісені, які зустрічаються при зберіганні молочних продуктів, відносять до родів *Geotrichumcandidum*, *Candida*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Catenularia*. Усі плісені активно викликають розпад жиру і білків. Вони аероби, але можуть рости і в глибині продукту при наявності порожнин і мінімальному доступі повітря [20].

Бактерії групи кишкових паличок – це основні санітарно-показові мікроорганізми. Відносять до цієї групи мікроорганізми, які входять до родини *Enterobacteriaceae*, об'єднують такі роди: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* і характеризуються загальними морфологічними, культуральними і біохімічними властивостями.

Із усіх бактерійгруппыкишечныхпалочек (БГКП) найбільше санітарно-показове значення мають мікроорганізми роду *Escherichia*, виявлення яких у харчових продуктах свідчить про свіже фекальне забруднення [12].

### **1.2.2 Мікроорганізми в виробництві м'ясних продуктів**

Ковбаси відносять до продуктів, що вживають у їжу без попередньої термічної обробки, тому ковбаси повинні відповідати високим санітарним вимогам.

Джерелами мікрофлори ковбасних виробів є сировина і технологічні операції підготовки і переробки: разрубка туш, обвалювання, жилування, посол, складання ковбасного фаршу, наповнення фаршем ковбасної оболонки.

Сировина є основним джерелом мікробного обсіменіння ковбас. Для виробництва ковбасних виробів допускається м'ясо, отримане від здорових вгодованих тварин. Умовно-придатне м'ясо можна застосовувати для виготовлення варених ковбас з дозволу ветеринарносанітарного нагляду після попереднього проварювання і з обов'язковим мікробіологічними дослідженням готової продукції. М'ясо сумнівної свіжості (з ознаками ослизнення, пліснявіння), має забруднення на поверхні дозволяють використовувати після санітарної обробки (промивання і зачистки) з подальшим мікробіологічним контролем готових ковбас [13].

У процесі розрубування туш, обвалювання і жилування різко збільшується кількість мікроорганізмів у м'ясі. Операції ці проводяться вручну, тому обсіменіння м'яса мікроорганізмами є неминучим.

Мікроорганізми розмножуються на обвалочний столах, ножах, руках робітників, так як там накопичується кров, м'язовий сік, що є сприятливим середовищем для розвитку мікробів [15].

Якісний склад мікрофлори обсемененого м'яса дуже різноманітний і складається з різних сапрофітних і умовно-патогенних мікроорганізмів: гнильних, кишкових, кокових бактерій, цвілевих грибів, дріжджів та ін. Можливе потрапляння патогенних мікроорганізмів (сальмонел та ін.).

Для зменшення ступеня мікробного обсіменіння сировини на цьому етапі необхідно скоротити тривалість її обробки і виконувати підготовчі операції при зниженій температурі в цеху.

Якісний склад мікрофлори фаршу в процесі дозрівання ковбас також зазнає змін. У складі первісної мікрофлори переважають бактерії групи кишкової палички, гнильні бактерії, стафілококи. У невеликій кількості виявляють молочнокислі бактерії, мікрококи, дріжджі. У процесі дозрівання ковбас збільшується кількість молочнокислих бактерій, мікрококів і дріжджів, вони стають переважаючими. У міру дозрівання в ковбасах відмирають грамнегативні палички, гнильні бактерії [14].

Зміна мікрофлори сирокочених ковбас пов'язано з комплексним впливом ряду факторів: підвищення концентрації солі, антисептичних копильних речовин, зневоднення середовища, зниження рН, мікробний антагонізм. Молочнокислі бактерії, мікрококи і дріжджі є стійкими до підвищеної концентрації кухонної солі, до копильних речовин, тому вони активно розмножуються в процесі сушіння виробів. Вони володіють антагоністичною дією на гнильні бактерії, кишкові бактерії, стафілококи. Антагоністичну дію молочнокислих бактерій і мікрококів обумовлено зміною рН ковбасного фаршу в кислу сторону, що несприятливо впливає на гнильні бактерії. Крім того, мікроби-антагоністи виробляють антибіотичні речовини [13].

Таким чином, під впливом комплексу бактерицидних і бактериостатичних чинників мікрофлора сирокочених ковбас істотно змінюється. Мікрофлору готових сирокочених і сиров'ялених ковбас складають молочнокислі бактерії видів *Lbs. plantarum*, *Lbs. brevis*, *Pediococcus cerevisiae*, *Leuconostoc dext.*, мікрококи, дріжджі роду *Debariomyces*. Ця мікрофлора ковбас є корисною і має суттєвий вплив на формування специфічних органолептичних властивостей сиров'ялених і сирокочених ковбас [8].

### 1.2.3 Мікроорганізми в хлібопекарській промисловості

Хлібобулочні вироби користуються широким попитом усіх верств населення. З огляду на це, до якості вказаних продуктів пред'являються високі вимоги не тільки по органолептичним і фізико-хімічними показникам, а й за їх безпеки для здоров'я людей [14].

Безпека продуктів харчування багато в чому залежить від мікробіологічних показників: загального мікробного обсіменіння, кількості санітарно-показових мікроорганізмів, відсутності патогенних і умовнопатогенних бактерій. Це також пов'язано не тільки з рівнем санітарногігієнічного стану виробництва, але і з дотриманням усіх вимог, що пред'являються до якості сировини, параметрам технологічного процесу [1].

У хлібопекарському виробництві мікроорганізми відіграють двояку роль: дріжджі і молочнокислі бактерії спеціально використовують для приготування тіста, а мікроорганізми, які попадають у сировину із зовнішнього середовища, є шкідниками. Вони знижують якість сировини, визивають порушення ходу технологічного процесу і псування готової продукції, можуть стати причиною харчових отруєнь.

Сировина, що використовується у хлібопекарському виробництві, поділяється на основну і додаткову. До основної сировини належить пшеничне і житнє борошно, дріжджі хлібопекарські, сіль кухонна харчова, вода; до додаткової – сировина, що застосовується згідно з рецептурою для надання виробам відповідних органолептичних і фізико-хімічних властивостей: цукор, жир, молоко, яйця, мак, горіхи, родзинки, солод, різні харчові добавки тощо. Усі види сировини повинні відповідати вимогам стандартів і забезпечувати високу якість готових виробів [16].

Технологія приготування тіста з борошна житнього і пшеничного різні, тому що в цих процесах беруть участь різні мікроорганізми.

У тісті мікроорганізми пристосовуються до нового середовища, це призводить до затримки росту клітин, потім вони починають швидко розмножуватися, тобто переходять у фазу швидкого росту. Із всіх мікроорганізмів борошна молочнокислі бактерії найбільш пристосовані до розвитку в тісті. Розмножуючись, вони утворюють молочну кислоту, яка негативно діє на інші мікроорганізми, і таким чином, створюються умови для розвитку переважно молочнокислих бактерій. Спочатку погибають мікроорганізми, які живуть у лужному середовищі, наприклад, гнилої бактерії, потім мікроорганізми, які розвиваються в нейтральному середовищі, –

бактерії групи кишкової палички. У разі подальшого збільшення кислотності гинуть уже кислотолюбиві бактерії – оцтовокислі, маслянокислі та інші. У борошні є мікроорганізми, які можуть розвиватися і при високій кислотності середовища, але для них необхідний кисень, тобто доступ повітря [27].

У тісті спостерігається симбіоз дріжджів і молочнокислих бактерій. Молочнокислі бактерії зброджують цукри з утворенням молочної кислоти, яка підкислює середовище, створює сприятливі умови для розвитку дріжджів. Дріжджі в процесі життєдіяльності збагачують середовище азотистими речовинами і вітамінами, які необхідні бактеріям. Молочна кислота пригнічує життєдіяльність інших мікроорганізмів (гнилісних, бактерій кишкової групи, оцтовокислих, маслянокислих і ін.), продукти життєдіяльності яких токсичні для дріжджів.

У спиртовому бродінні тіста з пшеничного і житнього борошна беруть участь дріжджі, які відносяться до сахароміцетів (*Saccharomyces cerevisiae* і *Saccharomyces cerevisiae*). Спиртове бродіння в тісті протікає в анаеробних умовах або при обмеженому доступі кисню повітря. У присутності кисню дріжджі одержують енергію в результаті процесів дихання, тобто ведуть себе, як аероби. Оптимальна температура розвитку хлібопекарних дріжджів біля 30°C [24].

Молочнокислі бактерії зброджують молочний цукор – лактозу з утворенням молочної кислоти і ряду побічних продуктів [12].

Присутність диких дріжджів і мікроскопічних грибів у тісті небажане, оскільки дикі дріжджі погіршують підйомну силу пресованих дріжджів, а мікроскопічні гриби визивають значні біохімічні зміни. Але вони аероби і розвиваються тільки при доступі повітря, тому головною перепоною розвитку диких дріжджів і мікроскопічних грибів є нестача повітря в тісті.

Дріжджі є представниками великого відділу грибів *Fungi* або *Micota*. Дріжджі виду *Saccharomyces cerevisiae* зброджують глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, частково раффінозу і прості декстрини солодового сусла; не зброджують лактозу, ксилозу, арабінозу, крохмаль і клітковину.

Дріжджі виду *Saccharomyces minor* специфічними для житнього тіста. Зброджують і засвоюють глюкозу, галактозу, сахарозу, раффінозу; не зброджують лактозу, ксилозу, арабінозу, крохмаль, клітковину. Характерною особливістю дріжджів цього виду є відсутність у них здатності зброджувати мальтозу і прості декстрини. Проте вони добре розмножуються в житніх заквасках, що пояснюється наявністю в житнього борошна вільних цукрів, а також забезпеченням доступних вуглеводів у результаті дії ферментів борошна і молочнокислих бактерій. За бродильною активності дріжджі *S. minor* поступаються виду *S. cerevisiae*, але вони менш вимогливі до джерел азотного і вітамінного харчування, більш кислотостійких і здатні розмножуватися в середовищі з рН 3,0-3,5 [10].

У процесі отримання пресованих дріжджів можуть розмножуватися також сторонні мікроорганізми. Найбільш небезпечними є наступні групи мікроорганізмів, які присутні в мелясі, мелясних розчинах, виробничих субстратах і готових пресованих дріжджах.

*Candidakrusei* – найбільш поширений шкідник дріжджового виробництва, здатний витіснити основну культуру. При значному вмісті їх у товарних дріжджах неминучі ускладнення в технологічному процесі і зниження якості хліба. *C. krusei* характеризується тим, що активно зброджує і засвоює лише глюкозу, тому в чистій культурі погано росте на мелясному середовищі.

*Candidamycoderma* – постійний супутник сахароміцетів у дріжджовому виробництві. Для цих дріжджів характерне утворення на рідких середовищах щільної товстої плівки, яка вповзає на стінки. *C. mycoderma*, володіючи високою швидкістю розмноження, здатна накопичуватися у великій кількості і швидко витіснити основну культуру [23].

*C. mycoderma* не володіє мальтажною активністю, за рахунок чого різко погіршуються хлібопекарські властивості дріжджів. На сусло-агарі утворює плоскі, матові, гладкі, рідше зморшкуваті колонії з рівним або мілко зазубреним краєм, білого або жовтуватого-сірого кольору.

*Candidautilis* – характерний представник супутньої мікрофлори дріжджового виробництва. Особливістю цього виду є використання нітрату калію в якості єдиного джерела азоту. На сусло-агарі утворює м'які блискучі гладкі з хвилястим краєм колонії сірого кольору. Псевдоміцелій розвинений слабо [28].

Представники роду *Bacillus* часто інфікують живильні середовища і товарні дріжджі. Вони широко поширені в природі і потрапляють у виробництво з сировиною, повітрям. Бацилі *Candidaguilliermondii* уповільнюють швидкість розмноження дріжджів, знижують вихід і стійкість дріжджів, сприяють автолізу дріжджових клітин [15].

Беспорові гнильні бактерії виявляються в мелясі, культивованих середовищах, товарних дріжджах. Ці бактерії зменшують вихід дріжджів, погіршують їх якість.

Патогенні для людини і тварин мікроорганізми є випадковими; вони потрапляють на зерно з ґрунту, розносяться гризунами і тваринами. З ґрунту на зернові культури можуть потрапляти збудники сибірської виразки, сапу, бруцельозу, туляремії та ін [10].

Мікроорганізми, що потрапили в борошно в процесі помелу зерна, при несприятливих умовах стають збудниками різних видів його псування: пліснявіння, самозігрівання, прокисання, прогіркання. При попаданні великої кількості спор гнильних бактерій видів *Bacillus subtilis* і *Bacillus mesentericus* в борошно вони стають причиною тягучого псування хліба [3].

У борошні, що має масову частку вологи не вище 15% і зберігається в умовах низької відносної вологості і постійної температури, мікроорганізми не розмножуються і поступово відмирають. При тривалому зберіганні знижується кількість бактерій *Erwinia herbicola*. Незначне збільшення вологості борошна (на 1-2%) призводить до швидкого зростання в ньому числа бактерій і грибів.

Найбільш поширеним видом псування борошна при зберіганні є пліснявіння.

Гриби роду *Aspergillus*, *Penicillium* розвиваються в борошні при більш низькій вологості, ніж бактерії. Борошно починає пліснявіти при відносній

вологості повітря вище 79%. Зацвіле борошно стає недоброякісним (темніє і набуває неприємного затхлого і пліснявого запаху). Зацвіле борошно знижує харчову цінність, зростає титруєма кислотність, погіршується якість клейковини, яка стає більш темною, короткорваною, втрачає еластичність і погано відмивається. Поширення пліснявіння у внутрішні шари продукту може призвести до самозігрівання, в результаті чого борошно втрачає сипучість, злежується в грудки або міцні брили [12].

### **1.3 Методи визначення мікроорганізмів та їх метаболітів в харчових продуктах**

В основі мікробіологічних методів дослідження харчових продуктів лежать процеси життєдіяльності мікроорганізмів. Ці методи використовуються для контролю мікробного забруднення сировини, технологічного обладнання та готової харчової продукції.

За правилами проведення сертифікаційних випробувань та гігієнічної експертизи продовольчих товарів та сировини, для кожної групи товарів існує перелік мікробіологічних показників, за якими вони повинні досліджуватися.

Класичні мікробіологічні методи дозволяють виявити та ідентифікувати мікроорганізми, які містяться у харчових продуктах, а також підрахувати їхню кількість. Але ці методи потребують наявності значної кількості лабораторного посуду, набору поживних середовищ, умов для забезпечення стерильності під час проведення дослідження та термостатів для культивування мікроорганізмів. Окрім того, визначення мікробіологічних показників класичними методами триває досить довго: до 3 діб потребує визначення КМАФАнМ (кількість мезофільних аеробних і факультативно анаеробних мікроорганізмів) та до 7 діб – дослідження на наявність мікроорганізмів псування (мікроскопічних грибів та дріжджів) [22].

Основу методів дослідження мікроорганізмів складають 2 процедури:

1- виділення – ізоляція визначеного мікроорганізму з існуючої в природі змішаної популяції.

2 - культивування (вирощування мікробної популяції в штучному середовищі в лабораторних умовах).

Виділення чистих культур шляхом висіву на чашки. Чисті культури утворюють на твердих середовищах окремі колонії – бактерії, дріжджі, міцелі альні гриби, одноклітинні водорості.

Організми ростуть на агаризованому середовищі, життєздатний організм утворює колонії, використовується посів на чашки штрихом, глибинний посів. Для виділення аеробів використовують метод глибинного посіву.

Мікроорганізми розрізняються по своїх потребах і тому не існує єдиного середовища і єдиного комплексу умов, які б забезпечували ріст усіх у природній популяції видів.

Не всі організми, здатні рости на твердих середовищах обов'язково поширюються по злегка вологій поверхні свіжо-розлитого середовища в чашці.

Це можна уникнути, якщо використовувати середовища з добре підсушеною поверхнею, по якій клітини пересуватися не можуть.

Спірохети і тіорганізми, що пересуваються шляхом ковзання (міксобактерії і ціанобактерії) можуть пересуватися, якщо поверхня підсушена. Здатність подібних організмів до пересування допомагає їхньому очищенню, тобто вони можуть відокремлюватися від інших видів.

Бактерії і гриби добре ростуть на твердих середовищах, багато найпростіші і водоростей можуть рости тільки в рідкому середовищі, багато вірусів вдається виділити використовуючи рідкі середовища.

Для вирощування бактерій у лабораторних умовах, дослідження їх різноманітних властивостей, тривалого зберігання використовують живильні середовища. Вони повинні відповідати певним стандартам, створюючи оптимальні умови для росту, розмноження й життєдіяльності мікроорганізмів. Упершу чергу, бактерії потребують азоту, вуглецю та водню для побудови власних білків. Водень і кисень для клітин постачає вода. Джерелом азоту виступають численні речовини, в основному, тваринного походження (м'ясо яловиче, риба, м'ясо-кісткове борошно, казеїн), а також білкові гідролізати, пептиди, пептони. Можна використовувати й замітники м'яса – плаценту, кров'яні згустки, дріжджі. Отже, до складу середовищ повинні бути введені джерела живильних речовин і вода, а також ростові фактори (вітаміни групи В, ферменти). Універсальним джерелом їх служать екстракти з білків тваринного й рослинного походження, білкові гідролізати. Для мікробів з більш складними харчовими потребами до складу середовищ включають нативні субстрати – кров, сироватку, асцитичну рідину, яєчний жовток, шматочки печінки, нирок, мозкової тканини та ін. Середовища повинні бути збалансованими за мікроелементним складом і містити іони заліза, міді, марганцю, цинку, кальцію, натрію, калію, мати у своєму складі неорганічні фосфати. Допускається застосування речовин, які усувають дію інгібіторів росту і токсинування мікробів (окремі амінокислоти, твіни, активоване вугілля тощо). Важливим є стабілізація оптимуму рН середовища, його високої буферності та рівень окисно-відновного потенціалу (Eh), який для аеробних мікроорганізмів досягає понад 0,08 В, а для анаеробних бактерій коливається в межах 0,12-0,60 В. Середовища повинні мати певну в'язкість, густину, мати певну вологість (до 20% води), бути ізотонічними, прозорими й обов'язково стерильними [22].

Залежно від потреб бактеріологів живильні середовища поділяються на п'ять основних груп. Перша група – універсальні (прості) середовища. До них належать м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) та м'ясо-пептонний агар (МПА). За своїм складом, наявністю живильних речовин вони придатні для культивування багатьох видів бактерій. Друга група – спеціальні середовища. Вони використовуються в тих випадках, коли мікроорганізми не ростуть на простих. До них належить кров'яний, сироватковий агари, сироватковий бульйон, асцитичний бульйон, асцит-агар та інші. Третя група – елективні середовища, на яких мікроорганізми певного виду ростуть швидше, більш інтенсивно, опереджають у своєму розвитку інші види бактерій. Наприклад, 1% лужна

пептонна вода є елективним середовищем для холерних вібріонів, середовища Ру та Леффлера – для збудників дифтерії. Четверта група селективні середовища, які завдяки додаванню певних компонентів (жовч, фарби, антибіотики та ін.) здатні пригнічувати розвиток одних видів мікроорганізмів, але не впливають на інші види. Так, середовище Мюллера є селективним для тифо-паратифозних бактерій, фуразолідоно-твіновий агар – для коринебактерій і мікрококів. Додавання антибіотиків до складу середовищ робить їх селективними для грибів (напр. середовище Сабуро та ін.). П'ята група – диференціально-діагностичні середовища. Це велика група середовищ, які дозволяють визначити певні біохімічні властивості мікроорганізмів і проводити їх диференціацію. Вони поділяються на середовища для визначення протеолітичних, пептолітичних, цукролітичних, гемолітичних, ліполітичних, редукуючи властивостей (середовища Ендо, Левіна, Плоскірева, Гісса).

В існуючих і перспективних методах мікробіологічного контролю можуть бути закладені фізичні, хімічні та біологічні принципи виявлення біологічних агентів. Біологічні методи контролю бактеріальної зараженості полягають у тому, що з досліджуваних проб (води, повітря, ґрунту, продуктів харчування, змивів техніки та ін.) виділяють мікроорганізми, висівають їх на живильні середовища і після термостатування з температурою підраховують число колоній, що вирости.

Розроблено методи визначення наявності мікроорганізмів у зразках за допомогою зондів барвників. Сутність їх полягає в тому, що в досліджувану пробу вводять розчин родаміну, реєструють інтенсивність його флуоресценції за довжини хвилі у при сутності бактерій, яку порівнюють з інтенсивністю флуоресценції стандартного розчин індикатору за тієї самої довжини хвилі. За результатами вимірів роблять висновок про наявність мікроорганізмів. Для досліджень брали 3 види мікроорганізмів: *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa*. Величина зміни інтенсивності флуоресценції індикатору залежала від виду бактерій та їхньої чисельності. Індикатор, наприклад резаурин, можна використовувати для визначення загального мікробного числа під час здійснення мікробіологічного контролю продуктів харчування.

Крім вищезазначених барвників, для тестування наявності мікроорганізмів можна застосовувати ряд інших, зокрема таких, як бензіндол і бензіндол, які у присутності мікроорганізмів змінюють свій колір.

Незважаючи на те, що звичайні мікробіологічні методи, застосовуються досить давно, вони мають певні обмеження. Проблеми з обмеженнями традиційних методів, а також нові можливості, спонукали до створення нового покоління швидких і альтернативних мікробіологічних методів. Швидкі мікробіологічні і альтернативні мікробіологічні методи збільшують швидкість або ефективність виділення, культивування або ідентифікації мікроорганізмів в порівнянні зі звичайними методами. В даний час значна увага приділяється вдосконаленню методів визначення збудників бактеріальної природи на основі прискорених способів бактеріологічного аналізу. Ґрунтуючись на різних властивостях мікроорганізмів та продуктів їх метаболізму, широко ведуться



дослідження для створення нових сучасних приладів для індикації мікроорганізмів [8, 11-15].

## **2. Експериментальна частина**

### **2.1. Об'єкти і методи дослідження**

#### **2.1.1. Об'єкти дослідження**

Об'єктом досліджень у роботі були методи виявлення мікроорганізмів та їх метаболітів у харчових продуктах, а також оцінка ефективності цих методів. Розглядалися традиційні та сучасні методи визначення вмісту сторонньої мікрофлори у продуктах харчування. Оцінювалися складність методики, тривалість проведення досліджень, точність отриманих результатів, можливість застосування у різних видах виробництв.

#### **2.1.2. Методи дослідження**

Під час виконання роботи застосовувалися первинні методи дослідження з метою збору інформації, опублікованої у вітчизняних та зарубіжних наукових виданнях, в офіційних збірниках Міжнародної програми ВООЗ щодо контролю та нагляду за харчовими інфекціями і токсикоінфекціями в Європі, вивчення наукових і науково-практичних джерел, щодо визначення мікроорганізмів та їх метаболітів у продуктах, спостереження за шляхами розвитку та вдосконалення цих методів та ін. Також з метою обробки та аналізу отриманих результатів використовувалися кількісний та якісний аналіз даних, їх систематизація, шкалювання та ін. Для оцінки ефективності методів, які в наш час застосовуються при проведенні мікробіологічних досліджень, здійснювалося порівняння результатів традиційних, сучасних хроматографічних, біосенсорних та експрес-методів за основними показниками кількісної та якісної інформації про зразки, що аналізуються, тривалістю дослідження, складністю підготовки і проведення аналізу, коштовністю обладнання [17].

### **2.2. Результати та їх обговорення**

Спектр і поширення небезпек у харчових продуктах постійно змінюється. Біологічні фактори в продуктах харчування тваринного походження є однією з головних причин виникнення захворювань харчового походження. Більшість збудників можуть передаватися через тварин, у яких немає будь-яких ознак хвороби, у продукти тваринного походження.

Необхідно зазначити, що проблема харчових інфекцій, включаючи і харчові зоонози, має глобальний характер, її розв'язання координується Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ), Продовольчою та

сільськогосподарською організацією (ФАО), Європейським органом з безпеки харчових продуктів [1].

На сучасному етапі розвитку вітчизняного виробництва, при проведенні мікробіологічних, фізико-хімічних і ряду інших досліджень харчової продукції зазвичай використовують тільки класичні (традиційні) методи, затверджені в уставленому порядку. Існує більше 40 різних методів виявлення мікробної контамінації харчових продуктів. Але навіть найшвидшими з них можна отримати результати через декілька годин.

З практики відомо, що основними представниками санітарно-показової перевірки харчових продуктів є наступні мікроорганізми: мезофільні аеробні і факультативно-анаеробні мікроорганізми (МАФАНМ), бактерії групи кишкових паличок (БГКП) – *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, коагулазопозитивні стафілококи [8].

*Staphylococcus aureus* (золотистий стафілокок) – перший з мікроорганізмів, у якого була виявлена стійкість до раніше безвідмовно діючих антибактеріальних препаратів (АБП). Стафілококове отруєння викликається переважно золотистим стафілококом *Staphylococcus aureus*. Ця інтоксикація зустрічається часто і посідає перше місце серед бактеріальних отруєнь [5].

Для визначення наявності мікроорганізмів золотистого стафілокока у поживне середовища вносять певні концентрації антибіотика, а потім засівають культурою досліджуваного мікроорганізму, після інкубації оцінюють наявність або відсутність видимого росту. Розрізняють методи серійних розведень в агарі або в бульйоні. Залежно від об'єму використаного бульйону, розрізняють методи серійних макро- та мікророзведень [9].

Для вивчення антибіотикочутливості золотистого стафілокока мікробіологічним методом, незалежно від виду методу, необхідно послідовно виконати такі етапи:

- приготувати поживні середовища (ПС);
- приготувати суспензії досліджуваних мікроорганізмів (інокулюми);
- внести інокулюм у поживне середовище;
- інкубувати посіви визначений проміжок часу за відповідних температурних параметрів;
- провести облік результатів та їх інтерпретацію, формулювання рекомендацій щодо лікування.

Молекулярно-генетичний метод кардинально відрізняється від всіх інших. Він має вкрай високу точність, тому що за допомогою полімеразно ланцюгової реакції (ПЛР) дозволяє виявити наявність резистентності в певного виду і навіть штаму мікроорганізмів у його генетичному апараті (кільцевій ДНК або плазмідах). Даний метод можна віднести до експрес-методів. Так, при використанні Real-time ПЛР ампліфікаторів або термоциклерів результат одержують через кілька годин.

Метод ПЛР не вимагає навіть виділення чистої культури збудника і дозволяє одночасно детектувати конкретні мікроорганізми в біологічних субстратах, взятих від хворого, і виявляти наявність у них генів стійкості до різних антимікробних препаратів (можливо одночасно до декількох).

Єдиним, але істотним недоліком такого методу є неможливість отримати дані про мінімальну концентрацію інгібування (МІК) конкретного антимікробного препарату для конкретного збудника інфекції, не можна визначати чутливість мікроорганізмів до антимікробних засобів, а тим більше кількісну характеристику у вигляді рівня МІК [2].

Для більш зручного і швидкого аналізу мікробіологічних показників золотистого стафілокока у харчових продуктах існують так звані петріфільми Petrifilm ТМ фірми 3М (США).

Петріфільми – це тест-пластини з поживним середовищем на підкладці, призначені для кількісного визначення різних груп мікроорганізмів. Петріфільм має багатошаровий структуру і складається з підкладки з середовищем яке покривається прозорою плівкою для збереження стерильності.

Середовища містять хромогенні субстрати та індикатори, фарбують колонії мікроорганізмів в характерний колір. Петріфільми містять готове поживне середовище, розчинний у воді гель, тетразолієвий індикатор для більш зручного підрахунку колоній та хромогенні субстрати, які дозволяють виявляти характерні для різних груп мікроорганізмів біохімічні процеси .

Використовуються різні хромогенні субстрати: для виявлення *E. coli* за  $\beta$ -глюкуронідазою, плісняви та дріжджів – за фосфатазою, *S. aureus* – за ДНК-азою. Індикатор дозволяє виявити ріст колоній на його початку [12].

Під час виготовлення петріфільмів застосовується технологія багатошарового наплення.

При цьому верхній шар являє собою полімерну плівку, яка саме містить індикатор і водорозчинний гель та вкрита клейкою речовиною, а підкладка – це покритий полімерною сумішшю папір з нанесеною на його поверхню сіткою, клейкий розчин, поживне середовище та водорозчинний гель. Завдяки сітці на петріфільмі полегшується підрахунок колоній.

Під час додавання досліджуваного зразка (харчовий продукт, вода або змив) у петріфільмі утворюється щільне поживне середовище. Стерильність підтримується завдяки зовнішній плівці.

Під час виконання аналізу у петріфільм вносять сам досліджуваний зразок об'ємом 1 мл або попередньо розведений дистильованою водою. Тест поміщають у термостат з температурою для культивування протягом 2-3 годин. Після чого підраховують кількість колоній вручну або за допомогою автоматичного Петріфільм-рідера (Petrifilm ТМ Plate Reader). Рідер дозволяє підрахувати кількість колоній, що вирости на петріфільмі, всього за 4 с.

За допомогою петріфільмів можна провести мікробіологічні дослідження води, харчових продуктів або змивів з поверхні обладнання на харчових виробництвах на наявність різноманітних мікроорганізмів, а також визначити їх кількість. Для цього існують такі тести:

- Petrifilm ТМ (АС) – для визначення КМАФАнМ;
- Petrifilm ТМ (ЕВ) – для визначення кількості ентеробактерій;
- Petrifilm ТМ (ЕЛ) – для визначення лістерій у змивах;
- Petrifilm ТМ (УМ) – для обліку пліснявих грибів та дріжджів;

– Petrifilm TM (EC) – для визначення *E.coli* та коліформних бактерій (БГКП);

– Petrifilm TM (RCC) – для визначення колі формних бактерій прискореним методом;

– Petrifilm TM (STX) – для визначення *S.aureus*;

– Petrifilm TM (SEC) – для визначення *E.coli*;

Мікробіологічні тести Petrifilm мають низку переваг, а саме:

– простота використання;

– миттєва готовність до використання (при цьому не потрібно готуватити стерилізувати поживні середовища);

– стабільність та надійність одержаних результатів;

– незначна тривалість аналізу при високій продуктивності;

– наявність сітки, що полегшує підрахунок колоній;

– наявність хромогенних індикаторів, які забезпечують чітку диференціацію колоній;

– зручність і компактність;

– мінімальна кількість відходів, що потребують утилізації.

Для визначення *E. coli* традиційними методами мікробіологічних досліджень використовують тверді поживні середовища (м'ясо-пептонний агар, триптон-соєвий агар та ін.) Метод ґрунтується на кількісному підрахунку колоній мікроорганізмів, що виростають в глибині і на поверхні щільного поживного агару при посіві глибинним методом і інкубації за температури  $30\pm 1^\circ\text{C}$  протягом  $72\pm 3$  год за аеробних умов [21].

Метод виявлення *E. coli* базується на здатності коліформних бактерій зброджувати лактозу та глюкозу з утворенням кислоти та газу за температури  $37\pm 1^\circ\text{C}$  протягом 24 год у спеціальних селективних середовищах.

Наявність коліформних бактерій встановлюють в середовищах ХБ (хинол-бромкрезол пурпурний), Хейфеця за зміною кольору індикатору, а в середовищі Кеслер – за наявністю газу в поплавку.

Наявність *E. coli* встановлюють в середовищі КОДА за зміною кольору індикатору. За росту коліформних бактерій, середовища ХБ і КОДА забарвлюються в жовтий колір; колір середовища Хейфеця коливається від світло-зеленого до жовтого.

Висновок щодо відсутності коліформних бактерій у середовищі Кеслер роблять на підставі відсутності газоутворення у найменшому з використаних розведень. Специфічна зміна середовища ХБ і КОДА не вимагає подальшого підтвердження.

На середовищі Ендо утворюються темно-червоні колонії з металевим блиском (Рис.1) або рожево-червоні без металевого блиску; на середовищі Плоскірева – цегляно- червоні з глянцевою поверхнею (Рис. 2); на середовищі Левіна – темно-фіолетові колонії або фіолетово-чорні блискучі (Рис. 3) [12, 14-15].



*Рис. 1* Утворення темно-червоних колоній *E. Coli* з металевим блиском на середовищі Ендо

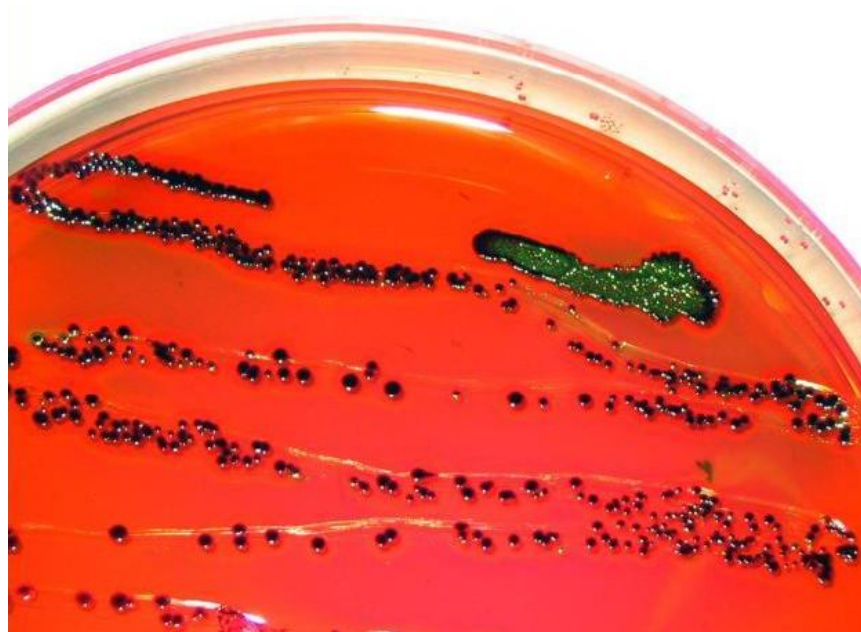


*Рис. 2* Утворення цегляно- червоних колоній *E. coli* з глянцевою поверхнею на середовищі Плоскірева



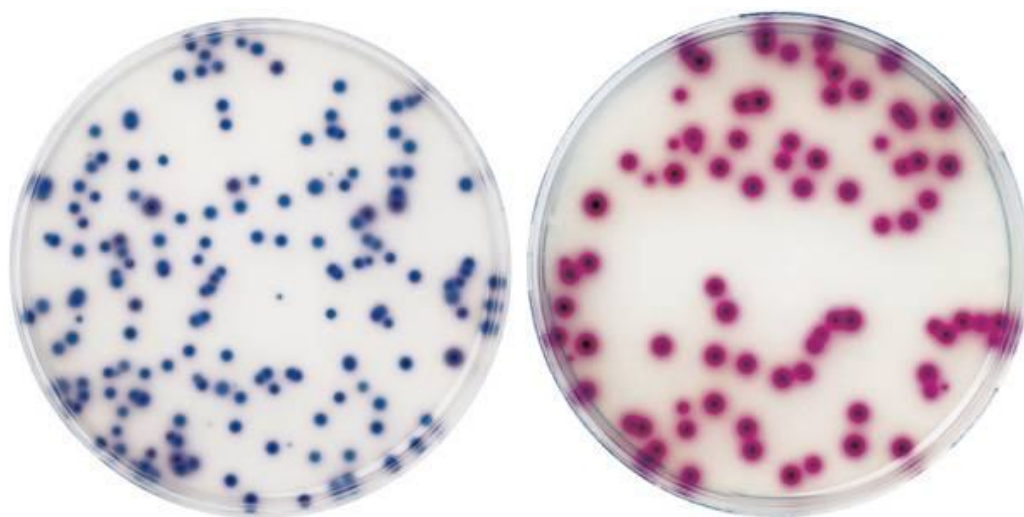
**Рис. 3 Утворення темно-фіолетових колоній *E. coli* на середовищі Левіна**

Метод визначення коліформних бактерій *E. coli* базується на здатності характерного для групи коліформних бактерій ферменту  $\beta$ -Д-галактозидази та специфічного для виду *E. coli* ферменту  $\beta$ -Д-глюкуронідази розщеплювати певні хромогенні субстрати з утворенням пігментів, що забарвлюють колонії коліформних бактерій у червоний колір (Рис. 4), а *E. coli* – від темно-синього до фіолетового (Рис. 5). Ефективність селективності хромогенного середовища забезпечує спеціальний реагент Тергітол-7, що пригнічує розвиток широкого кола грампозитивних та деяких грамнегативних бактерій за винятком виду *E. coli*. Додатковим тестом щодо підтвердження розмежування коліформних бактерій та *E. coli* служить реакція утворення індолу, з використанням реактиву Ковача [28]/



**Рис. 4 Забарвлення колонії коліформних бактерій у червоний колір**





**Рис. 5 Забарвлення колонії *E.coli* від темно-синього до фіолетового**

На заміну традиційним методам на сьогодні прийшли альтернативні (швидкі) методи мікробіологічних досліджень – методи мікробіологічних досліджень, що дозволяють за короткий проміжок часу визначити результати випробувань. Широкого застосування набули тест-системи RIDA ®COUNT. Даний метод заснований на використанні готових стерильних сухих підкладок, що представляють собою систему з поживними середовищами та хромогенними субстратами, специфічними для конкретного визначення. Підкладки герметично закриті непроникною мембраною, яка знімається перед посівом. Після нанесення досліджуваних об'єктів на підкладку, її закривають тією ж плівкою, вона ж забезпечує стерильність підкладки, поміщають в термостат і інкубують при відповідних температурах. Після інкубації здійснюють підрахунок забарвлених колоній з урахуванням розведень і початкового об'єму середовища [27].

Пластини RIDA ®COUNT представляють собою повністю готову до використання систему.

Проводять вивчення можливості використання тест-систем RIDA ®COUNT для оцінювання мікробіологічних показників якості продовольчої сировини, готової продукції, кормів для тварин і змивів з різних об'єктів, а також рівня мікробіологічної чистоти різних поверхонь [22].

Реформування системи державного регулювання питань, пов'язаних з безпечністю харчових продуктів, стосується перегляду відповідальності виробників за дотриманням вимог безпечності і якості харчових продуктів. А саме, сучасні мікробіологічні методи дослідження продукції тваринництва дозволяють виключити недоліки традиційних методів досліджень, скорочують число етапів дослідження, витрати поживних середовищ, трудовитрати і дозволяє досить швидко отримувати об'єктивні результати, скоротивши час проведення аналізу. Зазначене має велике значення при оцінюванні якості готової продукції, коли потрібне швидке отримання результату для своєчасної організації санітарних заходів [11].

В таблиці 1 наведено порівняльну характеристику тривалості традиційних та сучасних методів досліджень *E. coli* та *Staphylococcus aureus*.

Дані, щодо тривалості здійснення досліджень на наявність і вміст мікроорганізмів на їх метаболітів у харчових продуктах свідчать, що застосування сучасних методів аналізу надає можливість суттєво зменшити час

Таблиця 1

**Тривалість здійснення досліджень *E. coli* та *Staphylococcus aureus* традиційними та сучасними методами**

№	Мікроорганізм	Методи досліджень	Тривалість досліджень, год.
1.	<i>E. coli</i>	Традиційні	
		З використанням твердих поживних середовищ	72 ±3 год
		З використанням коліформних бактерій	24 год
		Сучасні	
		Тест-системи RIDA ®COUNT	2-4 год
2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	Традиційні	
		З використанням твердих поживних середовищ	72 ±3 год
		Серійних розведень в агарі або в бульйоні	72 ±3 год
		Сучасні	
		Молекулярно-генетичний метод	4-8 год
		Тест-пластини Petrifilm™	2-4 год

проведення досліджень. Навіть у тому випадку, коли тривалість аналізу традиційним методом скорочена до 24 годин, застосування сучасних методів дозволяє проводити мікробіологічні вимірювання у 6-16 разів швидше.



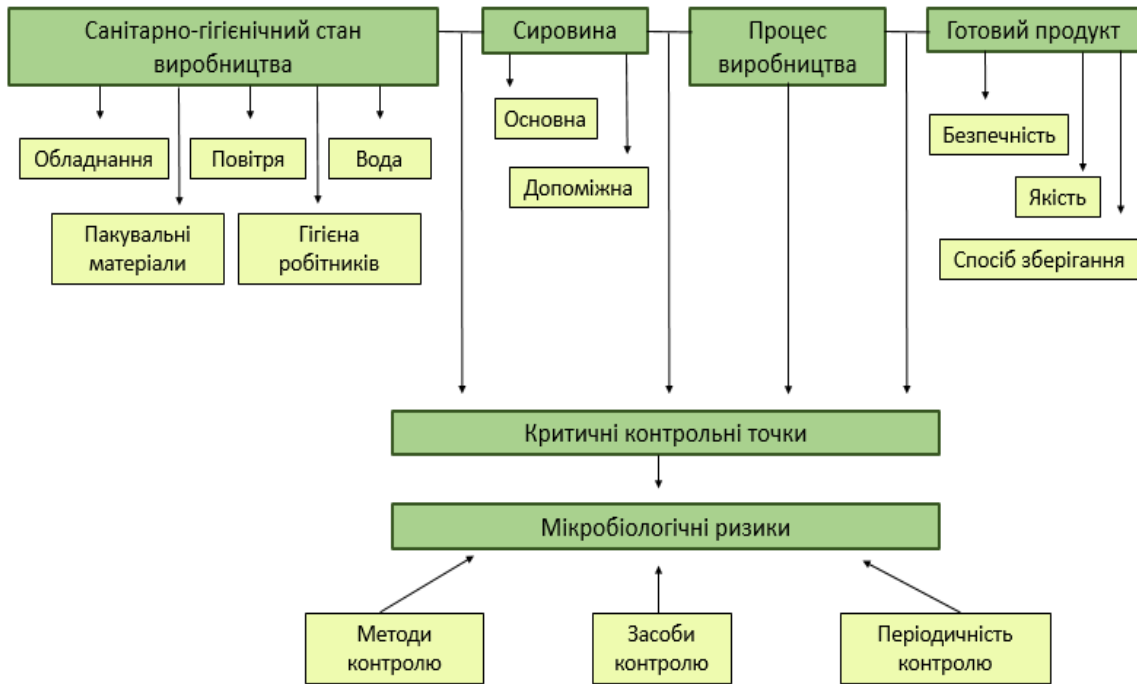
З урахуванням вимог виробництва щодо збільшення ефективності та безпечності отримання харчової продукції, це дозволяє не тільки скоротити час виявлення мікроорганізмів-контамінантів, але й значно покращити умови виробництва та якість продукції.

### 3. Технологічна частина

Для здійснення мікробіологічного контролю необхідно мати у наявності комплекс поживних середовищ, що забезпечують контроль всіх значимих мікроорганізмів. Основна вимога, що висувається до поживних середовищ – забезпечення ростових характеристик та специфічності на рівні арбітражних середовищ згідно з ДСТУ ISO 7251:2006 «Мікробіологія. Загальна настанова щодо підрахунку передбачуваної *Escherichia coli*. Метод найімовірнішого числа» та ДСТУ ISO 6888-1:2003 «Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод підрахунку коагулазопозитивних стафілококів (*Staphylococcus aureus* та інших видів). Для проведення аналізу». Можна застосовувати робочі середовища, приготовлені з окремих компонентів, склад та спосіб готування яких наведено у відповідних нормативних документах. Під час їх готування керуються настановами, викладеними у ДСТУ ISO/TS 11133-1:2005. Якщо застосовують стандартизовані сухі поживні середовища промислового виробництва, вони повинні бути дозволені до використання в Україні, мати сертифікат якості відділу контролю організації-виробника та інструкцію з використання. В разі готування робочих поживних середовищ з сухих комерційних, їх розчиняють у воді, стерилізують, використовують та зберігають відповідно до настанов виробника, зазначених на етикетці або у супровідних документах.

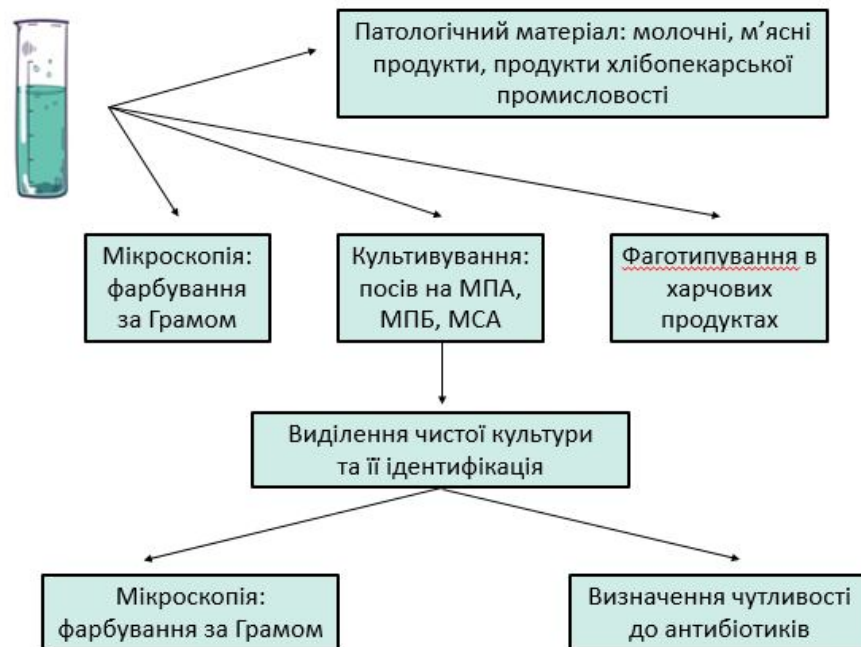
Наприклад, на молокопереробному підприємстві встановлюють критичні контрольні точки для кожного виду продукції, яку випускають, конкретні параметри виробництва наносять на технологічну схему і наводять у карті метрологічного забезпечення технологічної інструкції. Критичні контрольні точки, в яких проводиться мікробіологічне тестування, відображають на схемі з наведенням критеріїв оцінки. Технологічні схеми з основними критичними контрольними точками відображують у програмі виробничого контролю [6-7].

На рис. 6 зображено загальну схему мікробіологічного контролю виробництва продуктів переробки молока



**Рис. 6** Загальна схема мікробіологічного контролю виробництва продуктів переробки молока

Схема мікробіологічної діагностики золотистого стафілокока наведена на рис. 7.



**Рис. 7** Мікробіологічна діагностика золотистого стафілокока

Лабораторія повинна мати обладнання та засоби виміральної техніки (ЗВТ), що необхідні для проведення досліджень.

Прилади, що використовуються, повинні відповідати нормам безпеки і електромагнітної сумісності. Все лабораторне обладнання має бути заземлене, перевага віддається застосуванню трьохконтактних штепсельних вилок.

Обладнання та ЗВТ повинні відповідати вимогам нормативних документів на методи досліджень, що проводить лабораторія, і утримуватися в умовах, що забезпечують їх зберігання, захист від пошкоджень та передчасного зношування.

На обладнання, що потребує періодичного технічного обслуговування, повинні бути затверджені графіки технічного обслуговування, а для ЗВТ – графіки повірки.

Лабораторні меблі відрізняються і особливою конструкцією, завдяки якій досягається поєднання окремих предметів, їх мобільність. Найнадійнішими і довговічними вважаються ті вироби, в яких передбачена заміна елементів, що вийшли з ладу.

Прилади, меблі та обладнання розміщують таким чином, щоб забезпечити найбільшу зручність у роботі, простоту використання, чищення, знезараження, контролю і найменші затрати часу на переходи.

Столи, на яких проводяться мікроскопічні дослідження при денному освітленні, повинні розміщуватись біля вікон. Лабораторні меблі повинні бути з пластиковим покриттям або пофарбовані олійною (емалевою) фарбою світлих тонів.

Лабораторні стільці повинні мати гігієнічне покриття, що добре миється. Внутрішні та зовнішні поверхні меблі вповинні бути гладкими, без щілин та пазів, що утруднюють обробку знезаражуючими речовинами.

Робочі поверхні столів повинні бути із водонепроникного, кислото-лужностійкого, вогнетривкого матеріалу, який не псується від обробки УФ променями та дезінфікуючи миросчинами.

Газові пальники повинні утримуватися в чистоті та порядку, для чого їх періодично розбирають і чистять; мати справнікрани і м'які з'єднуючі шланги, що не допускають проникнення газу до приміщення.

Центрифугу розміщують так, щоб працівник був в змозі бачити і правильно розміщувати на її дні стакани [1-3].

#### **4. Безпека життєдіяльності**

Підтвердження безпеки продуктів на мікробіологічні показники, можливо перевірити тільки в спеціалізованих, акредитованих, відповідно обладнаних, мікробіологічних лабораторіях. Робота із харчовими продуктами у ході аналізу на наявність в них мікроорганізмів та їх метаболітів актуальними на даний момент методами (розглянуті у ході дослідження в попередніх розділах) виконується в умовах підвищеної небезпеки для працівника [4].

Технологічний процес функціонування будь-якої мікробіологічної лабораторії пов'язаний з ризиком:

- отруєнь, алергізації, опіків та інших уражень, пов'язаних із застосуванням отруйних і вогнебезпечних речовин, сильних кислот, лугів, аерозолів і т.д.;
- зараження персоналу при дослідженні матеріалів, що містять збудники інфекційних і паразитарних захворювань;

- виникнення шкідливих і небезпечних факторів при роботі зі спеціальними приладами, апаратами, обладнанням і скляним посудом;
- ураження людей електричним струмом;
- виникнення вибухо- і пожежонебезпечної ситуації [1-3].

Працівники лабораторій можуть піддаватися впливу небезпечних і шкідливих виробничих факторів, основними з яких є:

- хімічні чинники, в тому числі деякі речовини біологічної природи (підвищений рівень токсичних продуктів, отруйних, сильнодіючих речовин в повітрі робочої зони, що утворюються в процесі роботи);
- біологічні фактори: патогенні мікроорганізми, а також мікроорганізми-продуценти, що містять живі клітини та спори мікроорганізмів і білкові препарати (небезпека зараження працівників при дослідженні матеріалів, підвищена запиленість повітря робочої зони біологічними речовинами);
- фізичні фактори: аерозолі, неіонізуючі електромагнітні випромінювання, статичні, електричні і магнітні поля, шум, вібрація, ультразвук, мікроклімат, освітленість, небезпека ураження електричним струмом, небезпека травмування гострими частинами посуду, використовуваного в процесі роботи;
- психофізіологічні чинники, включаючи підвищену напругу органів зору;
- пожежо- і вибухонебезпечні чинники [17].

До виконання робіт в лабораторіях, основним вектором яких є визначення мікроорганізмів та їх метаболітів у харчових продуктах, повинні допускатися особи:

- з відповідною професійною підготовкою і кваліфікацією згідно з чинними нормативно-правовим законодавством;
- що пройшли в установленому порядку навчання, інструктаж, перевірку знань з питань охорони праці;
- що пройшли медичний огляд і не мають медичних протипоказань [1].

Задля мінімізації впливу шкідливих та небезпечних факторів лабораторія повинна відповідати санітарним правилам і гігієнічним нормативам, а також вимогам пожежної безпеки.

Роботи з використанням шкідливих хімічних речовин (фіксування матеріалу, приготування реактивів, подрібнення, тощо) повинні проводитися у витяжній шафі.

Летючі хімічні речовини зберігаються на віддалі від нагрівальних приладів і відкритого вогню. Зберігання отруйних речовин здійснюється в спеціальних коморах, в металевих шафах або сейфах. Кислоти і луги зберігаються в скляному закритому посуді на нижніх полицях шаф окремо від реактивів і фарб. При розведенні концентрованих кислот щоб уникнути розбризкування кислоти додають в воду (а не навпаки). Для розливу з ємностей об'ємом 10-20 л в дрібну тару застосовуються засоби малої механізації (перекидачі, сифони) [3].

Рівні концентрації і інші параметри небезпечних і шкідливих виробничих факторів і трудового процесу, що виникають при роботі в лабораторіях, не

повинні перевищувати допустимих значень, передбачених в діючих санітарно-гігієнічних нормах та інших нормативно-правових актах.

Забезпечення пожежо- та вибухобезпеки здійснюється відповідно до чинних нормативно-правовими актами в галузі пожежної безпеки.

Електробезпека забезпечується відповідно до чинних нормативно-правових актів в цій галузі.

В лабораторії повинні бути розроблені і затверджені докладні інструкції з охорони праці для персоналу по окремих ділянках робіт лабораторії, з огляду на специфіку ділянок. Затверджені інструкції повинні бути вивішені на видному місці кожної ділянки роботи.

Особи, знову прийняті на роботу в лабораторію, допускаються до роботи тільки після відповідного інструктажу з охорони праці та пожежної безпеки відповідно до профілю їх роботи і перевірки знань з охорони праці та пожежної безпеки. Інструктаж, подальше навчання і перевірка знань з охорони праці та пожежної безпеки проводяться відповідно до чинних нормативно-правовими актами в галузі охорони праці.

Працівники повинні проходити попередній (під час вступу на роботу) і періодичні медичні огляди. Всі робочі місця в лабораторії повинні пройти спеціальну оцінку умов праці.

Персонал лабораторії повинен бути забезпечений робочим одягом та засобами індивідуального захисту.

Відповідальність за охорону праці в лабораторії покладається на її завідувача (керівника), а по окремих ділянках - на їх керівників.

Перед початком досліджень зразків харчової продукції (на початку кожної зміни, трудового дня) слід перевіряти справність технологічного обладнання, наявність і справність протипожежного інвентарю, наявність засобів індивідуального захисту, засобів дегазації, роботу вентиляційних установок, електроустаткування.

Технологічні процеси лабораторії повинні бути організовані відповідно до вимог діючих технологічних документів (норм, інструкцій, регламентів), затверджених в установленому порядку. Виробничі процеси слід проводити тільки при наявності справних контрольно-вимірювальних приладів, технологічного оснащення та інструменту.

До початку робіт в приміщенні лабораторії слід проводити прибирання вологим способом. Пил з поверхні столів, приладів, обладнання, підлокітників слід витирати чистою ганчіркою, зволоженою дезінфікуючим розчином. Підлоги необхідно протирати ганчіркою, змоченою в дезрозчині, відповідно до вимог санітарних норм.

У разі виявлення в процесі роботи недоліків в експлуатації або несправності апаратів, приладів і обладнання працівники повинні інформувати про це завідувача лабораторією [4].

Забезпечення правильної організації охорони праці в мікробіологічній лабораторії тісно пов'язане з правильною організацією технологічних процесів. Це зумовлено тим, що визначення санітарно-біологічних показників продуктів харчування є легко порушуваним процесом. Як наслідок, незважне ставлення

до охорони праці може стати результатом не тільки травматизму та захворювань працівників, а й значних перевитрат часу та матеріалів.

Таким чином, метою системи управління охороною праці в лабораторії мікробіологічного напрямку є зниження виробничого травматизму і професійної захворюваності, поліпшення умов праці і забезпечення безпеки дослідницького процесу, так само як і підвищення «чистоти» проведених досліджень (мінімізацію впливу на них зовнішніх виробничих чинників).

Завданнями системи управління охороною праці є:

- забезпечення постійного поліпшення умов праці і безпеки;
- профілактика травматизму працівників;
- забезпечення контролю, в тому числі громадського, за дотриманням нормативно-правових актів про охорону праці;
- захист інтересів працівників, які постраждали від нещасних випадків;
- забезпечення працівників спеціальним одягом, взуттям, засобами індивідуального та колективного захисту, санаторно-побутовим обслуговуванням за рахунок роботодавця;
- проведення профілактичних медичних оглядів працівників;
- своєчасне навчання керівників і фахівців з охорони праці;
- проведення спеціальної оцінки умов праці;
- санітарно-побутове обслуговування працюючих;
- забезпечення безпеки будівель, споруд та обладнання;
- підвищення ефективності робіт з охорони праці [17].

## ВИСНОВКИ

Забезпечення мікробіологічної безпеки харчових продуктів є одним з пріоритетних завдань, вирішення якого безпосередньо спрямоване на охорону здоров'я населення. У всьому світі дана проблема набуває особливої актуальності у зв'язку зі збільшенням числа захворювань, що передаються через харчові продукти.

Розглянуто традиційні та сучасні методи дослідження *Staphylococcus aureus* та *E. coli*, та проведено порівняльну характеристику ефективності традиційних та сучасних методів досліджень *E. coli* та *Staphylococcus aureus*.

Застосування тест-системи RIDA ®COUNT для виявлення *E. coli* у продуктах харчування дозволяє скоротити час випробувань порівняно з традиційними методами проведення досліджень у 6-16 разів.

Аналіз мікробіологічних показників золотистого стафілокока у харчових продуктах за допомогою петріфільмів Petrifilm ТМ триває 2-4 години, що у 18 разів менш ніж при використанні традиційного методу досліджень.

Молекулярно-генетичний метод виявлення *Staphylococcus aureus* не вимагає виділення чистої культури збудника і дозволяє одночасно детектувати конкретні мікроорганізми в біологічних субстратах, тривалість його здійснення складає 4-8 годин, що у 9 разів швидше порівняно з традиційними методами.

Перевагами сучасних методів дослідження мікроорганізмів та їх метаболітів у харчових продуктах є також простота використання, зручність і компактність, мінімальна кількість відходів, що потребують утилізації.